

脯氨酸（PRO）含量测定试剂盒说明书

(货号:BP10049F-96 分光法 96 样 有效期: 9 个月)

一、指标介绍:

植物体内游离脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性, 抗旱性强的品种往往积累较多的脯氨酸。因此测定脯氨酸含量可以作为抗旱育种的生理指标。另外, 由于脯氨酸亲水性极强, 能稳定原生质胶体及组织内的代谢过程, 因而能降低凝固点, 有防止细胞脱水的作用。在低温条件下, 植物组织中脯氨酸含量增加, 可提高植物的抗寒性, 因此, 亦可作为抗寒育种的生理指标。

当用碘基水杨酸提取植物样品时, 脯氨酸便游离于碘基水杨酸的溶液中, 然后与酸性茚三酮加热反应后形成红色物质, 该红色物质在 520nm 处有最大吸收峰, 进而通过比色法测定植物体内游离脯氨酸的含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	1. 使用前摇匀; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 若有沉淀, 50℃水浴加热两分钟使其溶解, 用前摇匀; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 石英比色皿、离心管、分光光度计、**冰醋酸(乙酸)**、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取

① 组织样本: 称取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 转移至 1.5mLEP 管后, 于 90℃水浴振荡提取 10min; 25℃×12000 rpm, 离心 10min, 取上清, 冷却后待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 液体样本: 取 0.1mL 液体样本加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 转移至 1.5mLEP 管后, 于 90℃水浴振荡提取 10 分钟, 12000rpm, 25℃离心 10min, 取上清, 冷却后待测。

【注】：若增加样本量，可按照液体体积（mL）：提取液体体积(mL)为 1：5~10 的比例提取。

③ 细菌/培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞至 EP 管中，加 1mL 的提取液，于 90℃水浴振荡提取 10min；25℃×12000 rpm，离心 10min，取出上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（10⁴个）：提取液体体积（mL）为 500:1 比例进行提取。

2、检测步骤

① 分光光度计预热 30min 以上（等待仪器过自检程序亦可），调节波长至 520nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

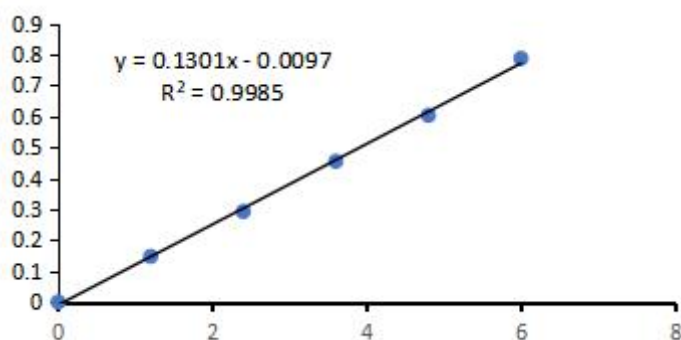
试剂组分（μL）	测定管	空白管（仅做一次）
样本	300	
蒸馏水		300
冰醋酸	300	300
试剂一	600	600
置 95℃水浴中加热 30min（盖紧封口，防止盖子爆开水分散失），冷却至室温。吸取 800μL 澄清溶液于 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 520nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】：1. 吸光度 ΔA 线性范围为 0.01-1.0，若 ΔA 超过 1.0 可减少样本加样量 V1（如减至 150μL，则冰醋酸相应增加）则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。

2. 若 ΔA 值低于 0.005，可增加样本加样体积 V1（如增至 450μL，则冰醋酸减至为 150μL），或增加样本取样质量 W，可改变后的 V1 和 W 需带入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.1301x - 0.0097$ ；x 为标准品质量（μg），y 为 ΔA 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸(Pro)含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0097) \div 0.1301] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 25.62 \times (\Delta A + 0.0097) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸(Pro)含量}(\mu\text{g/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0097) \div 0.1301] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 25.62 \times (\Delta A + 0.0097) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

4、按液体体积计算：

$$\text{脯氨酸(Pro)含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.0097) \div 0.1301] \div [V2 \times V1 \div (V + V2)] \times D$$

$$=281.83 \times (\Delta A + 0.0097) \times D$$

5、按细菌/细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸(Pro)含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0097) \div 0.1301] \div [V2 \times V1 \div (V + V2)] \times D \\ &= 281.83 \times (\Delta A + 0.0097) \div 500 \times D \end{aligned}$$

V---提取液的总体积，1mL； V1---加入反应体系提取液的体积，0.3mL；
V2---液体样品量，0.1mL； W---样品质量，g；
500---细菌或细胞总数，万； D---稀释倍数，未稀释即为1。
Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的BCA蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，也可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液（1mg/mL）：标准品溶解在1mL蒸馏水中，充分混匀。
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，4，8，12，16，20 μg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 100uL，加入 4.9ml 蒸馏水，混匀得到 20 μg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μg/mL	0	4	8	12	16	20
标品稀释液 uL	0	80	160	240	320	400
水 uL	400	320	240	160	80	0
各标准管混匀待用。						

5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去0浓度吸光值，过0点制作标准曲线。

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	150	
蒸馏水		150
冰醋酸	150	150
试剂一	300	300
置 95℃ 水浴中加热 30min（盖紧封口，防止盖子爆开水分散失），冷却至室温。吸取 200μL 澄清液体于 96 孔板中，立即于 520nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		