

脯氨酸（PRO）含量测定试剂盒说明书

（货号：BP10049W-196 微板法 196 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。

当用磺基水杨酸提取植物样品时，脯氨酸便游离于磺基水杨酸的溶液中，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 110mL×2 瓶	4℃保存	每瓶： 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 63mL×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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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）：提取液体积（mL）为 500:1 比例进行提取。

2、检测步骤：

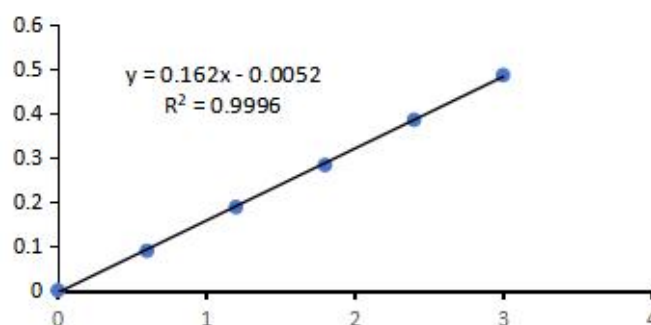
- ① 酶标仪预热 30min 以上（等待仪器过自检程序亦可），调节波长至 520nm。
- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白管（仅做一次）
样本	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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

- 【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 V_1 （如减至 100μL，则冰醋酸相应增加），则改变后的 V_1 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 V_1 （如增至 300μL，则冰醋酸减至为 0μL），或增加样本取样质量 W ，可改变后的 V_1 和 W 需带入公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.162x - 0.0052$ ； x 为标准品质量 (μg)； y 为 ΔA 。



- 2、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸 (Pro) 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0052) \div 0.162] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 41.15 \times (\Delta A + 0.0052) \div W \times D \end{aligned}$$

- 3、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸(Pro)含量}(\mu\text{g/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0052) \div 0.162] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 41.15 \times (\Delta A + 0.0052) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

- 4、按照液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸 (Pro) 含量}(\mu\text{g/mL}) &= [(\Delta A + 0.0052) \div 0.162] \div [V_2 \times V_1 \div (V + V_2)] \times D \\ &= 452.67 \times (\Delta A + 0.0052) \times D \end{aligned}$$

- 5、按细菌/细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸(Pro)含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0052) \div 0.162] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 41.15 \times (\Delta A + 0.0052) \div 500 \times D \end{aligned}$$

V ---提取液的总体积，1mL；

V_1 ---加入反应体系提取液的体积，0.15mL；

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, 亦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 $\mu\text{g/mL}$ 。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 20ug/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{g/mL}$	0	4	8	12	16	20
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	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)
标准品	150	
蒸馏水		150
冰醋酸	150	150
试剂一	300	300
置 95°C 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 200 μL 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。		