

脯氨酸脱氢酶（PDH）试剂盒说明书

（货号：BP10091W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

脯氨酸脱氢酶(proline dehydrogenase, PDH, EC 1.5.1.2) 催化脯氨酸生成 Δ^1 -二氢吡咯-5-羧酸的反应，是脯氨酸降解过程的限速步骤。脯氨酸是分布最广泛的一种渗透物质，在胁迫条件下很多植物可以通过增加合成、减少降解而在体内累积大量脯氨酸，降低 PDH 活性对于防止渗透胁迫对植物造成伤害、保护细胞结构等方面具有重要意义。

脯氨酸脱氢酶(PDH)催化脯氨酸脱氢并使 NAD^+ 还原成 NADH, 通过检测 NADH 在 340nm 处的增加速率即可得出 PDH 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

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	
试剂一	粉体 1 支	4℃ 避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	粉体 1 支	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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、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：

称取约 0.1g 组织样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【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、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	10
试剂二	140
试剂三	10

轻轻混匀，室温（25℃）下，可先孵育 6min 后于 340nm 处读取 A1，30min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

- 【注】 1. 若 ΔA 值小于 0.01，可适当延长反应时间 T（如由 30min 增至 60min 后或更长读取 A2），或增加样本加入量 V1（如由 40 μ L 增至 80 μ L 或更多，则试剂二相应减少）；或适当增加样本取样质量 W，改变后的 T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。
2. 若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样量 V1（如减至 20 μ L，则试剂三相应增加），则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。
- 或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4℃离心 10min，上清液用于检测；
3. 若上升趋势不稳定，可以每隔 2min 读取一次吸光值，选取一段线性上升的时间段 T 参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内生 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PDH(nmol/min/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 53.6 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织在每分钟内生 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PDH(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 53.6 \times \Delta A \div W$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

V2---反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$ L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ L / mol /cm；

W---样本质量，g；

T---反应时间，30min；

Cpr---蛋白浓度（mg/mL），建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。