

Δ1-吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS）试剂盒说明书

（货号：BP10427F 紫外法 24 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

Δ1-吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS）是植物体内脯氨酸生物合成的关键酶，同时也是植物在遭受胁迫时脯氨酸合成的限速酶；脯氨酸作为一种渗透调节物质，与植物对干旱和盐胁迫的适应性密切相关。所以 P5CS 在调节脯氨酸的代谢水平上具有重要作用。

Δ1-吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS）催化谷氨酸转化成γ-谷氨酸半醛，同时使 NADPH 氧化成 NADP⁺，通过检测 NADPH 在 340nm 处的下降速率，即可得出 P5CS 酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	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。
试剂二	粉体 2 支	4℃保存	每支： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 每支分别加入 0.6mL 蒸馏水溶解备用； 3. 用不完的试剂分装后 -20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂三	液体 26mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉体 2 支	-20℃保存	每支： 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，可 -20℃分装保存。

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、紫外分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样本情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：

取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清液待用。

【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 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：澄清的液体样本直接检测，若浑浊则离心后取上清检测。

2、检测步骤：

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 制备对照管样本：取出同一个样本的部分上清液至一新 EP 管中，于 95℃ 水浴中煮沸 10min 后取出，冷却至室温后于 12000rpm，4℃ 或者室温离心 10min，取离心后的上清液作为该样本的对照管样本备用。
- ④ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	120	120（煮沸的样本）
试剂一	20	20
试剂二	20	20
试剂三	520	520
试剂四	20	20
混匀，室温（25℃）下，30s 时立即于 340nm 处分别读取吸光值 A1，10min 后读取 A2， $\Delta A = (A1 - A2)$ 测定 - $(A1 - A2)$ 对照（每个样本需做一个自身对照）。		

【注】1. 若 ΔA 的值在零附近徘徊，则可延长反应时间 T（如增至 30min 或更长），或加大样本量 V1（如增至 180μL，则试剂三相应减少），则改变后的反应（孵育）时间 T 或加样体积 V1 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（则试剂三相应增加），则改变后的加样体积需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氧化 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 93.8 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算：

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

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 93.8 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞数量计算：

单位定义：每 10^4 个细胞在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活单位（U）。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol/min} / 10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.188 \times \Delta A$$

4、液体中 P5CS 活力的计算：

单位定义：每毫升液体在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 93.8 \times \Delta A$$

V---提取液体积，1mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.12mL；

V2---反应体系总体积：7×10⁻⁴ L；

d---光径，1cm；

T---反应时间，10min；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数，6.22×10³ L / mol / cm；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。