

Δ1-吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS）试剂盒说明书

（货号：BP10427W 微板法 48 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 60mL×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 13mL×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）、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温。
- 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 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	40	40 (煮沸的样本)
试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	130	130
试剂四	10	10
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 40min 或更长)，或加大样本量 V1 (如增至 60μL，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。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 160.8 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 160.8 \times \Delta A \div W$$

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)。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.322 \times \Delta A$$

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。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 160.8 \times \Delta A$$

V---提取液体积，1mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.04mL；

V2---反应体系总体积： 2×10^{-4} L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

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， 6.22×10^3 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。