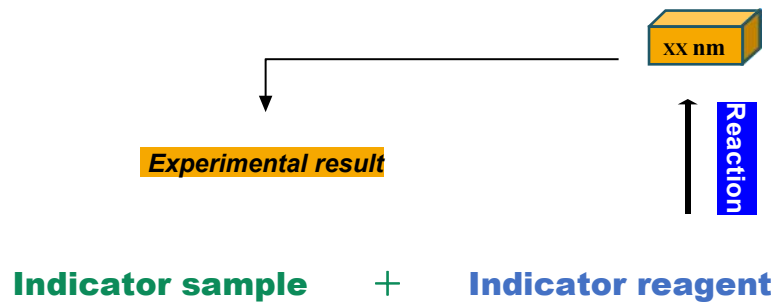


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

## 脯氨酸脱氢酶（ProDH）活性检测试剂盒说明书

### 微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液一	液体 100 mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	液体 1.2 mL×1 支	4℃保存	
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存	

#### 溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4℃保存；
- 2、试剂三：临用前加入 4 mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4℃保存；
- 3、试剂四：临用前加入 5 mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂可分装-20℃保存，避免反复冻融。
- 4、工作液的配制：首先将试剂三和试剂四配成溶液，临用前根据用量按照试剂一（V）：试剂二（V）：试剂三（V）=1.6（mL）：0.2（mL）：0.15（mL）的比例充分混匀。（注意：现配现用，用多少配多少）

#### 产品说明：

ProDH是存在于线粒体内的催化脯氨酸降解的关键酶。降低ProDH活性对于调节渗透平衡、防止渗透胁迫对植物造成伤害、清除自由基、保护细胞结构具有重要意义。

ProDH催化脯氨酸脱氢生成延丙酮酸，脱下的氢通过吩嗪二甲酯硫酸（PMS）传递还原2,6-二氯酚靛酚（DCPIP），并且在600nm处具有特征吸收峰，通过600nm吸光度的下降，测定2,6-DCPIP的还原速度，代表ProDH活性。

**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

#### 需自备的仪器和用品：

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、丙酮、匀浆器/研钵、冰、蒸馏水。

#### 操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、组织：按照组织质量（g）：提取液一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液一），进行冰浴匀浆，1500g 4℃离心 15min，取上清液于一支新的 EP 管中，加入 10 μL 提取液二，涡旋混匀，冰浴放置 30min 后，15000g 4℃离心 20min，取上清置冰上待测。

2、细胞或细菌：按照细胞数量（10<sup>4</sup> 个）：提取液一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液一），冰浴匀浆，1500g 4℃离心 15min，取上清液于一支新的 EP 管中，加入 10 μL 提取液二，涡旋混匀，冰浴放置 30min 后，15000g 4℃离心 20min，取上清置冰上待测。

#### 二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热30min以上，波长调至600nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、工作液置于 37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）水浴 5min。
- 3、加样表（在微量玻璃比色皿/96孔板中分别加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	空白管
工作液	160	160
试剂四	20	20
样本	20	-
蒸馏水	-	20

在微量玻璃比色皿/96孔板中分别加入上述试剂，充分混匀后于600nm处测定10s时的吸光值，迅速置于37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）水浴3min，拿出迅速擦干测定190s时的吸光值（有控温功能的酶标仪可以将温度设置为25℃或者37℃），空白管10s和190s的吸光度分别记为A1、A2，测定管10s和190s的吸光度记为A3、A4。计算 $\Delta A_{测定} = A3 - A4$ ， $\Delta A_{空白} = A1 - A2$ ， $\Delta A = \Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}$ （空白管只需做1-2次）。

#### 三、ProDH酶活计算

##### A、按微量玻璃比色皿计算

1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每分钟每mg组织蛋白在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{反总} \div (V_{样} \times C_{pr}) \div T = 333.33 \times \Delta A \div C_{pr}$$

2、按样本质量计算：

单位定义：每分钟每g组织在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/g 质量)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{反总} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div T = 333.33 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算：

单位定义：每分钟每1万个细胞在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.67 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.2mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL；

$T$ ：反应时间，3min； $C_{\text{pr}}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL； $W$ ：样本质量，g；500：500万个细胞。

## B、按96孔板计算

### 1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每分钟每mg组织蛋白在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.005为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 666.67 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

### 2、按样本质量计算：

单位定义：每分钟每g组织在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.005为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/g 质量)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 666.67 \times \Delta A \div W$$

### 3、按细胞数量计算：

单位定义：每分钟每1万个细胞在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.005为一个酶活力单位ProDH

$$\text{(U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.33 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.2mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL；

$T$ ：反应时间，3min； $C_{\text{pr}}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL； $W$ ：样本质量，g；500：500万个细胞。

## 注意事项：

1.  $\Delta A$ 大于0.6时或者 $A_{340}$ 大于1.5时建议将样本上清用蒸馏水稀释后再进行测定。
2. 控制 $A_{340}$ 在0.8以上（96孔板在0.4以上），若 $A_{340}$ 小于0.8（用96孔板数值小于0.4时），建议将样本上清用蒸馏水稀释后再进行测定。
3. 空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过0.02。