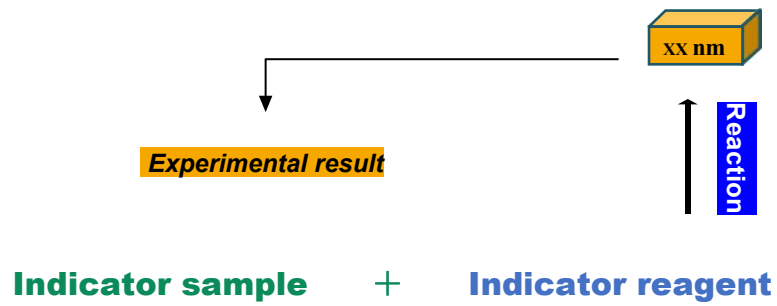


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



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

可见分光光度法

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 60 mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	液体 0.6 mL×1 支	4℃保存	
试剂一	液体 40 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 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 10 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、1 mL玻璃比色皿、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（10⁴ 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、分光光度计预热30min以上，波长调至600nm，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1mL玻璃比色皿中分别加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	空白管
工作液	800	800
试剂四	100	100
样本	100	—
蒸馏水	—	100

在1mL玻璃比色皿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，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ΔA测定=A3-A4，ΔA空白=A1-A2，ΔA=ΔA测定-ΔA空白（空白管只需做1-2次）。

三、ProDH酶活计算

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。

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

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0.01为一个酶活力单位。

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

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反总：反应体系总体积，1mL；V样：加入样本体积，0.1mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，3min；Cpr：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、 ΔA 大于0.6时或者 A_3 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_3 在0.8以上，若 A_3 小于0.8，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。