

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0940

Size: 100T/96S

脯氨酸脱氢酶 (ProDH) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义：

ProDH 是存在于线粒体内的催化脯氨酸降解的关键酶。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 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。

二、测定原理：

利用异硫氰酸甲酯检测 ProDH 催化的脱氢反应，600nm 处吸光值的吸光值的变化反映酶活性的高低。

三、需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	100mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 2mL × 1 支	4℃ 保存	
试剂二	液体 25mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	粉剂 × 1 瓶	4℃ 保存	临用前加入 4mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4℃ 保存
试剂四	粉剂 × 1 瓶	4℃ 保存	临用前加入 4mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4℃ 保存
试剂五	粉剂 × 4 支	4℃ 保存	

五、粗酶液提取：

按照组织质量(g) 提取液体积(mL) 为1:5~10 的比例(建议称取约0.1g 样本, 加入1mL 提取液) 进行冰浴匀浆, 1500g 4℃离心 15min, 取上清液于一支新的 EP 管中, 加入一滴试剂一(用 10 μL 的枪头加入) 涡旋混匀, 冰浴放置 30min 后, 16000g 4℃离心 20min, 取上清置冰上待测。

六、测定步骤：

1、 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 600nm, 蒸馏水调零。

2、 样本测定

(1) 混合液的配制：首先将试剂三和试剂四配成溶液(见试剂的组成和配制), 临用前根据用量按照试剂二(V) : 试剂三(V) : 试剂四(V) =2.4 (mL) : 0.3 (mL) : 0.3 (mL) 的比例充分混匀。(注意：现配现用, 用多少配多少), 置于 30℃水浴 5min;

(2) 试剂五的配制：取试剂五一支, 临用前加入 500 μL 蒸馏水充分溶解待用, 现配现用。

(3) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 35 μL 样本、15 μL 试剂五和 150 μL 混合液, 混匀, 立即记录 600nm 处初始吸光值 A1 和10min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A=A2-A1$

七、ProDH 活性计算：

● 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.01 \div T = 57.14 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

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。

$$\text{ProDH (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 57.14 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； V 样：加入样本体积，0.035mL； V 样总：加入提取液体积，1 mL； T：反应时间，10 min； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g。

● 用 96 孔板测定的计算公式如下

(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。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.005 \div T = 114.29 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

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。

$$\text{ProDH (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 114.29 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； V 样：加入样本体积，0.035mL； V 样总：加入提取液体积，1 mL； T：反应时间，10 min； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g。