



吡咯啉-5-羧酸合成酶活性检测试剂盒

P5CS Assay Kit

可见分光光度法

产品编号: AK390V

产品规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK390-A	60 mL×1 瓶	4℃保存;
AK390-B	6 mL×1 瓶	4℃保存;
AK390-C	6 mL×1 瓶	4℃保存;
AK390-D	粉剂×1 瓶	4℃保存, 用时加入 25 mL 蒸馏水, 溶解后 4℃保存一周;
AK390-E	粉剂×1 瓶	4℃保存, 用时加入 25 mL 蒸馏水, 溶解后 4℃保存一周;
AK390-F	25mL×1 瓶	室温保存;
AK390-G	10mL×1 瓶 (10mmol/L 标准磷贮备液)	4℃保存; 0.5μmol/mL 标准磷应用液配制: 蒸馏水 20 倍稀释, 充分混匀;

定磷剂的配制: 按 $H_2O : AK390-D : E : F = 2:1:1:1$ 的比例配制, 配好的定磷剂应为浅黄色。若无色则试剂失效, 若是蓝色则为磷污染, 定磷剂现用现配。

注意: 配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器, 也可以用一次性塑料器皿, 避免磷污染。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 脯氨酸是植物体内适应逆境胁迫的一种重要的渗透调节物质。高等植物中脯氨酸代谢因其初始底物不同, 分为谷氨酸 (Glu) 和鸟氨酸 (Orn) 两条合成途径。吡咯啉-5-羧酸合成酶 (Pyrroline-5-carboxylic acid synthase, P5CS) 是以谷氨酸为前体合成脯氨酸途径的关键酶, 对植物适应逆境胁迫起关键作用。

原理: 吡咯啉-5-羧酸合成酶催化谷氨酸生成 P5C 过程中分解 ATP 生成 ADP 和无机磷, 通过钼酸铵比色法测定单位时间内产生无机磷的量可确定 P5CS 活性。

自备用品:

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

酶液提取:

1. 组织样品: 按照组织质量 (g) : AK390-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK390-A), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 660nm。
2. 酶促反应 (在 EP 管中加入下列试剂)

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)
AK390-B		100
样本		100
混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 准确水浴 10min		

AK390-C	100	100
AK390-B	100	
样本	100	
混匀，8000g，25℃离心 10min，取上清液		

3. 定磷（在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂）

	空白管(ul)	标准管(ul)	对照管(ul)	测定管(ul)
0.5μmol/ml 标准磷应用液		100		
上清液（μL）			100	100
蒸馏水（μL）	100			
定磷试剂（μL）	1000	1000	1000	1000
混匀，室温放置 30min，在 660nm 处，记录各管吸光值。				

注意：

1. 由于每一个样都必须做对照，本试剂盒 100 管保证测 48 份 P5CS 活性。
2. 此法具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管要求严格无磷。
3. 空白管和标准管只要做一管。每个测定管设一个对照管。

P5CS 酶活性计算：

1. 血清（浆）P5CS 活力的计算

单位定义：每小时每毫升血清（浆）中 P5CS 消耗 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{P5CS 活力 (}\mu\text{mol/h/mL)} = \frac{C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div V \text{ 样} \div T}$$

$$= 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

2. 组织中 P5CS 活力的计算

（1）按蛋白浓度计算：

单位定义：每小时每毫克组织蛋白中 P5CS 消耗 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{P5CS 活力 (}\mu\text{mol/h /mg prot)} = \frac{C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T}$$

$$= 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

（2）按样本鲜重计算：

单位定义：每小时每克组织中 P5CS 消耗 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{P5CS 活力 (}\mu\text{mol/h /g 鲜重)} = \frac{C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T}$$

$$= 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

注：C 标准管：标准管浓度，0.5μmol/mL；V 总：酶促反应总体积，0.3mL；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，1/6 小时；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))