

脯氨酸(PRO)含量检测试剂盒说明书

Proline Assay Kit

微量法

货号: AK135

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES19	液体 100mL×1 瓶	4℃保存;
AK135-A	冰乙酸 30mL×1 瓶	(自备) 4℃保存;
AK135-B	液体 30mL×1 瓶	4℃保存;
AK135-标准品	粉剂×1 支	4℃保存, 临用前加入 1 mL 蒸馏水, 配成 10 mg/mL 标准品储备液。

※ 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 (Proline, PRO) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 逆境条件下, 植物体内 Pro 含量显著增加。Pro 增加量在一定程度上反映了抗逆性, 抗旱性强的品种往往积累较多的脯氨酸。因此, 脯氨酸增加量可以作为抗逆育种的生理指标之一。

原理: 用磺基水杨酸 (SA) 提取 Pro, 加热处理后, Pro 与酸性茚三酮溶液反应生成红色; 在 520nm 测定吸光度。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、水浴锅、天平、离心机、可调式移液枪、冰乙酸、研钵、冰和蒸馏水。

样品准备:

1. 细菌、细胞样品的制备:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液 ES19 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES19), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 之后置沸水浴振荡提取 10min; 10000g, 常温离心 10min, 取上清, 冷却后待测。

2. 组织样品的制备:

组织: 按照组织质量 (g): 提取液 ES19 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 ES19), 进行冰浴匀浆; 之后置沸水浴振荡提取 10min; 10000g, 常温离心 10min, 取上清, 冷却后待测。

3. 血清 (浆) 样品的制备:

按照血清 (浆) 体积 (mL): 提取液 ES19 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议取 0.1mL 血清 (浆) 加入 0.9mL 提取液 ES19), 充分混匀, 之后置沸水浴振荡提取 10 分钟, 10000g, 常温离心 10 分钟, 取上清, 冷却后待测。

测定步骤:

- 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 520nm, 蒸馏水调零。
- 标准品的处理: 将标准品用蒸馏水稀释为 20、15、10、7.5、5、2.5、1 μ g/mL 的标准溶液。
- 样本测定:

试剂名称	空白管 (ul)	测定管 (ul)	标准管 (ul)
蒸馏水	250		

上清液		250	
标准品			250
AK135-A	250	250	250
AK135-B	250	250	250
混匀后盖紧盖子，缠好封口膜，置于沸水浴中保温 30min，每 10min 振荡一次，冷却后吸取 0.2mL 于比色皿或者 96 孔板中在 520nm 波长处比色，记录吸光值 A 测定管、A 标准管、A 空白管，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。空白管只需做 1-2 次。			

Pro 含量计算：

1. 以标准溶液浓度为横坐标， ΔA 标准为纵坐标绘制标准曲线，得到线性回归方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 代入方程得到 x ($\mu\text{g/mL}$)。
2. 按照血清（浆）体积计算
 $\text{Pro 含量 } (\mu\text{g/mL}) = 10 \times x$
3. 按照样本质量计算
 $\text{Pro 含量 } (\mu\text{g/g 鲜重}) = x \times V_{\text{提}} \div W = x \div W$
4. 按照细菌或细胞密度计算
 $\text{Pro 含量 } (\mu\text{g}/10^4\text{cell}) = x \times V_{\text{提}} \div \text{细胞/细菌数量} = x \div \text{细胞/细菌数量}$

注： $V_{\text{提}}$ ：加入提取液体积，1mL； W ：样本质量，g；细胞/细菌数量：以 10^4 为单位，万个；10：血清稀释倍数， $(0.1+0.9) \div 0.1=10$ 。

注意事项：

1. 提取液中含有蛋白沉淀剂，提取的上清液不能用于蛋白浓度的测定。
2. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。