

脯氨酸(PRO)含量检测试剂盒说明书

Proline Assay Kit

可见分光光度法

货号：AK134

规格：50T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
提取液 ES19	液体 60mL×1 瓶	4℃保存
AK134-A	冰乙酸 35mL×1 瓶	(自备) 4℃保存
AK134-B	液体 35mL×1 瓶	4℃保存
AK134-标准品	粉剂×1 支	4℃保存

※ 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；加甲苯萃取后，在 520nm 测定吸光度。

自备用品：

可见分光光度计、1ml 石英比色皿、水浴锅、天平、烘箱、玻璃管、离心机、可调式移液枪、冰乙酸 35mL、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 (10⁴ 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 min，取上清，冷却后待测。

测定步骤：

- 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 520nm，蒸馏水调零。
- 标准品的处理：临用前加入 1 mL 蒸馏水，配成 10 mg/mL 标准品，再将标准品用蒸馏水稀释为 50、25、10、5、2.5 μg/mL 备用。
- 样本测定：

试剂名称	空白管 (ml)	测定管 (ml)	标准管(ml)
蒸馏水	0.5		

上清液		0.5	
标准品			0.5
AK134-A	0.5	0.5	0.5
AK134-B	0.5	0.5	0.5

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 1mL 于比色皿中，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 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，可以增加样本或者稀释样本后再进行测定。