



微信公众号

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	25 mL×1 瓶	4℃保存；
AK390-B	5 mL×1 瓶	4℃保存；
AK390-C	5 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	1mL×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 H₂O : 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：配试剂最好用新的烧杯、玻璃棒和玻璃移液器，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 (Pyroline-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：

可见外分光光度计、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：

- 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。
- 血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

- 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 660nm。
- 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°C (哺乳动物) 或 25°C (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:

- 由于每一个样都必须做对照, 本试剂盒 50 管保证测 24 份 P5CS 活性。
- 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。
- 空白管和标准管只要做 1-2 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。

$$\begin{aligned} \text{P5CS 活力 (U/mL)} &= C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{P5CS 活力 (U/mg prot)} &= C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V_{\text{总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{P5CS 活力 (U/g 鲜重)} &= C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V_{\text{总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{总}}) \div T \\ &= 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

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](#))