

脯氨酸脱氢酶（ProDH）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1081

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞和真菌

产品简介

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。本试剂盒提供了一种简单、方便、快速的 ProDH 活性检测方法，其原理是 ProDH 催化脯氨酸脱氢生成吡咯啉-5-羧酸，脱下的氢通过吩嗪二甲酯硫酸（PMS）传递，从而还原 2,6-二氯酚（2,6-DCPIP）。2,6-DCPIP 在 600nm 处具有特征吸收峰，通过检测 600nm 处吸光值的吸光值的变化反映酶活性的高低。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液一	50mL	100mL	4℃ 保存
提取液二	1mL	2mL	4℃ 保存
试剂一	12.5mL	25mL	4℃ 保存
试剂二	9mL	18mL	4℃ 避光保存
试剂三	0.5mL	1mL	-20℃ 避光保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 600nm 处的吸光度）

96 孔板或微量比色皿、可调节式移液枪及枪头

水浴锅、制冰机，低温离心机

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：小管试剂开盖前，请先低速离心。

提取液一和二：即用型；4℃ 保存。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 避光保存。

试剂三：即用型；整个实验过程中，冰上避光放置；分装-20℃ 避光保存。

样本制备

组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液一，冰浴匀浆，1500g 4℃ 离心 15min，取上清液于一支新的 EP 管中，加入 10 μL 提取液二，涡旋混匀，冰浴放置 30min 后，16000g 4℃ 离心 20min，取上清置冰上待测。

细胞或真菌：收集 500 万细胞或真菌到离心管内，用冷 PBS 清洗，离心后弃上清，加入 1mL 提取液一，冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。然后 1500g 4℃ 离心 15min，取上清液于一支新的 EP 管中，加入 10 μL 提取液二，涡旋混匀，冰浴放置 30min 后，16000g 4℃ 离心 20min，取上清置冰上待测。

产品说明书

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存1个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用Bradford法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或分光光度计预热30min以上，调节波长到600nm。分光光度计去离子水调零。
2. 试剂二于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）孵育10min。
3. 在96孔板或微量玻璃比色皿中依次加入10μL样本、180μL试剂二和10μL试剂三，迅速混匀后于600nm检测，记录30s和5min30s的吸光值，分别记为 A_1 和 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

注意：1. 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果 ΔA 小于0.001可适当加大样本量；如果 ΔA 大于0.3，可用提取液一稀释样品，计算时结果乘以稀释倍数。

2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在25℃（一般物种）或者37℃（哺乳动物）。

3. 因通过反应速率计算酶活，使用96孔板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定4-8个样本），不推荐同时测多个样本。

结果计算

A. 使用96孔板测定的计算公式

1. 按样本鲜重计算：

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚定义为一个酶活性单位U。

$$\text{ProDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 384.76 \times \Delta A \div W$$

2. 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚定义为一个酶活性单位U。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 380.95 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯酚摩尔消光系数， 21×10^3 mol/L/cm； d ：96孔板光径，0.5cm； 10^9 ：1mol=1×10⁹nmol； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1.01mL； T ：反应时间，5min； W ：样本质量，g； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL。

B. 使用微量比色皿进行测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d ：0.5cm调整为 d ：1cm进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

- PMK1046 脯氨酸（PRO）检测试剂盒（微量法）
- PMK1090 半胱氨酸（Cys）检测试剂盒（微量法）
- PMK1093 赖氨酸（LYS）检测试剂盒（微量法）
- PMK1814 谷氨酸脱羧酶（GAD）检测试剂盒（微量法）
- PMK1114 线粒体苹果酸脱氢酶（MDHm）检测试剂盒（微量法）
- PMK1109 琥珀酸脱氢酶（SDH）检测试剂盒（微量法）



更多产品详情了解，请关注公众号：