

吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 检测试剂盒 (微量法)

货号: PMK1087

保存: 4°C 避光保存 12 个月

规格: 48T/96T

适用样本: 动植物组织、细菌、真菌

产品简介

脯氨酸 (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。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 (P5CS, $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase) 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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法, 用于检测生物体内吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 活性, 其原理是吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 催化谷氨酸生成吡咯啉-5-羧酸 (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来测定 P5CS 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4°C 保存
试剂二	6mL	12mL	4°C 保存
试剂三	6mL	12mL	4°C 保存
试剂四	粉剂 × 1 瓶	粉剂 × 1 瓶	4°C 保存
试剂五	粉剂 × 1 瓶	粉剂 × 1 瓶	4°C 保存
试剂六	12.5mL	25mL	室温保存
标准品	1mL	1mL	4°C 避光保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计 (能测 660nm 处的吸光度) 及恒温箱

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

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

试剂一: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂二: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂三: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂四: 临用前配制, 48T 加入 12.5mL 去离子水充分溶解, 96T 加入 25mL 去离子水充分溶解。未用完的试剂可 4°C 保存一周或分装后 -20°C 保存, 避免反复冻融。

试剂五: 临用前配制, 48T 加入 12.5mL 去离子水充分溶解, 96T 加入 25mL 去离子水充分溶解。未用完的试剂可 4°C 保存一周或分装后 -20°C 保存, 避免反复冻融。

产品说明书

试剂六：即用型；使用前，平衡到室温；室温保存。

定磷剂的配制：配制比例按照 H₂O : 试剂四 : 试剂五 : 试剂六=2:1:1:1 的比例配制，配好的定磷试剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染（请根据需要，用多少配多少）。

注意：配试剂最好用新的玻璃器皿或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。

标准曲线设置：按下表所示用去离子水将 10mM 标准品稀释为 4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625mM 的标准溶液。

	标准品体积 (μL)	去离子水体积 (μL)	标准品浓度 (mM)
Std. 1	400μL 10mM	600	4
Std. 2	100μL of Std. 1	100	2
Std. 3	100μL of Std. 2	100	1
Std. 4	100μL of Std. 3	100	0.5
Std. 5	100μL of Std. 4	100	0.25
Std. 6	100μL of Std. 5	100	0.125
Std. 7	100μL of Std. 6	100	0.0625

样本制备

组织或真菌子实体：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 试剂一，冰浴匀浆，8,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

细菌或可进行计数的真菌：收集 500 万细菌或真菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细菌或真菌，离心后弃上清，加入 1mL 试剂一，冰浴超声波破碎细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。然后 8,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

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. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 660nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 酶促反应（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

	空白管 (μL)	标准管 (μL)	测定管 (μL)	对照管 (μL)
试剂二	0	0	100	0
样本	0	0	100	0

混匀后盖紧，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确孵育 10min

试剂三	0	0	100	100
试剂二	0	0	0	100
样本	0	0	0	100

混匀，8000g，25℃离心 10min，取上清液

3. 定磷（在 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入下列试剂）

上清	0	0	20	20
不同浓度标准品	0	20	0	0
去离子水	20	0	0	0

产品说明书

定磷试剂	200	200	200	200
------	-----	-----	-----	-----

混匀，室温静置 30min，测定 660nm 吸光值。计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。

注意：1. 所用容器要求严格无磷。

2. 空白和标准曲线只需做 1 次，每个测定设一个对照。

3. 为保证实验结果的准确性，需先取 1-2 个样做预实验，如果测定的吸光值过高（高于 2.0）可用试剂一稀释样本后再测定，计算结果时注意乘以稀释倍数。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. 无机磷 (Pi) 含量的计算

将 $\Delta A_{\text{测}}$ 带入方程得到 y 值 (mM)。

3. P5CS 活性计算

(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产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\text{P5CS 活性 (U/g 鲜重)} = (y \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T = 200 \times y \div W$$

(2) 按细菌或真菌数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或真菌在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位

$$\text{P5CS 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (y \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T = 0.4 \times y$$

(3) 按样本蛋白浓度计算

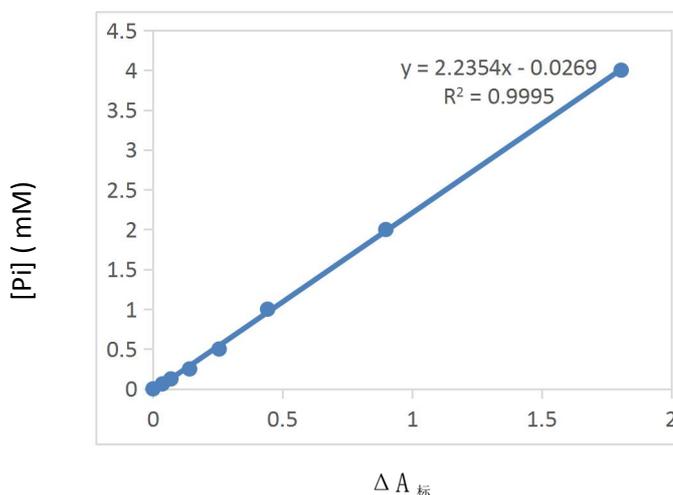
单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\text{P5CS 活性 (U/mg prot)} = (y \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 200 \times y \div C_{\text{pr}}$$

$V_{\text{酶促}}$ ：酶促反应体系总体积， 2×10^{-4} L； 10^6 ：单位换算系数， $1\text{mmol} = 10^6\text{nmol}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.1mL； $V_{\text{提取}}$ ：加入试剂一体积，1mL；T：反应时间，10min；W：样本重量，g；500：细胞总数，500 万；cpr：样本蛋白浓度，mg/mL。

结果展示

典型标准曲线—以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



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。

产品说明书

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)

更多产品详情了解，请关注公众号：

