

吡咯啉-5-羧酸还原酶 (P5CR) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC5385

规格: 100T/48S

产品内容: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 600μL×1 支	-20℃保存
试剂一	液体 5mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂四	液体 4mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	-20℃保存

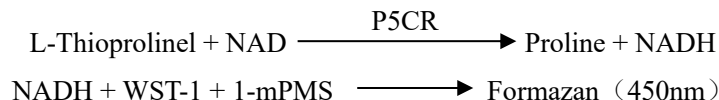
溶液的配制:

- 1、提取液二: 易挥发试剂, 用完及时拧盖封口放回-20℃。
- 2、**提取液**的配制: 根据样本量按提取液一: 提取液二=0.99mL: 0.01mL (1T) 的比例配制提取液, 现用现配, 禁止提前配制。
- 3、试剂三: 临用前取一支试剂三加入 5.6mL 试剂一, 充分混匀。未用完的试剂分装保存, -20℃保存可以保存 4 周, 避免反复冻融。
- 4、标准品: 临用前加入 1.4 mL 蒸馏水, 即 2 μmol/mL NADH 标准液。未用完的试剂分装保存, -20℃可以保存 2 周, 避免反复冻融。临用前取 100μL 的 2 μmol/mL NADH 标准液于 EP 管中, 加入 700μL 蒸馏水充分溶解, 配制成 0.25μmol/mL 的 NADH 标准液。现用现配。

产品说明:

吡咯啉-5-羧酸还原酶(pyrraline-5-carboxylate reductase, P5CR)是广泛存在于原核和真核生物中的一种重要的管家蛋白。在 NAD(P)H 的作用下, 吡咯啉-5-羧酸(P5C)在吡咯啉-5-羧酸还原酶作用下转化为脯氨酸, 并且 P5CR 还被发现能够在大肠杆菌中参与到硫代脯氨酸 (Thioprolin) 的代谢过程。

硫代脯氨酸在吡咯啉-5-羧酸还原酶催化作用下脱氢, 并伴随着 NAD 转化为 NADH。在 1-mPMS 作用下, WST-1 可与 NADH 反应, 产生水溶性 formazan, 在 450nm 下有特征吸收峰



注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、蒸馏水和冰。

操作步骤:

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 1、组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 2、细菌或培养细胞：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），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 3、血清（浆）等液体：直接测定。（若溶液呈现浑浊，则离心取上清后再测定）。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm，可见分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、操作表：

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管	空白管
试剂二	90	90	90	90
试剂三	90	-	-	-
蒸馏水	-	90	90	110
试剂四	20	20	20	20
标准品	-	-	20	
样品	20	20	-	-

充分混匀，37℃反应显色 30min，取 200μL 于微量玻璃比色皿或 96 孔板中，测定在 450nm 处的吸光度。记作 A_{测定}，A_{对照}，A_{标准}，A_{空白}。ΔA_{测定}=A_{测定}-A_{对照}，ΔA_{标准}=A_{标准}-A_{空白}。（标准管和空白管只需做 1-2 次。）

三、P5CR 活性计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟催化产生1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$P5CR \text{ 活性 (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 8.333 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

(2) 按样本质量计算

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$P5CR \text{ 活性 (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 8.333 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

(3) 按细菌或细胞数目计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟催化产生1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$P5CR \text{ 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 0.0167 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

(4) 按血清（浆）等液体体积计算

单位的定义：每mL血清（浆）等液体每分钟催化产生1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$P5CR \text{ 活性 (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3 \times F = 8.333 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

$C_{标准}$: NADH标准液的浓度, 0.25 μ mol/mL; $V_{样}$: 反应体系中加入的样本体积, 0.02mL; $V_{样总}$: 加入的提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 30min; C_{pr} : 蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 500: 细胞或细菌数目, 500万; 10^3 : 单位换算系数, 1 μ mol/mL=10³nmol/mL; F : 样本稀释倍数。

注意事项:

1. 如果 $A_{测定}$ 大于 1.8 或者 $\Delta A_{测定}$ 大于 1, 可以减少样品量或者缩短反应时间; 若 $\Delta A_{测定}$ 小于 0.01, 可以加大样品量或者延长反应时间至 1h 或者更长时间。计算公式注意同步修改

实验实例:

- 1、称取 0.0993g 橙子叶, 加入提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=0.318-0.288=0.03$, $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}=0.538-0.181=0.357$, 带入公式计算:
 $P5CR活性(U/g \text{ 质量})=8.333 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W \times F=8.333 \times 0.03 \div 0.357 \div 0.0993=7.052 \text{ U/g 质量}$
- 2、称取 0.1006g 小鼠肾脏组织, 加入提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=0.369-0.274=0.095$, $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}=0.538-0.181=0.357$, 带入公式计算:
 $P5CR活性(U/g \text{ 质量})=8.333 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W \times F=8.333 \times 0.095 \div 0.357 \div 1.006=22.042 \text{ U/g 质量}$
- 3、吸取 0.02mL 羊血清, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=0.299-0.146=0.153$, $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}=0.538-0.181=0.357$, 带入公式计算:
 $P5CR活性(U/mL)=8.333 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W \times F=8.333 \times 0.153 \div 0.357=3.571 \text{ U/mL}$

参考文献:

[1] FENG Chang-Z, XIE Y H, CAO Y, et al. Expression, Purification and Physicochemical Characteristics of Pyrroline-5-Carboxylic Acid Reductase in Drosophila[J]. Chinese Journal of Biological Engineering, 2012, 32(6):8.

相关系列产品:

- BC0290/BC0295 脯氨酸 (Pro) 含量检测试剂盒
- BC4420/BC4425 1-吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 活性检测试剂盒

