

吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

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(P5CS, Δ 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。

测定原理:

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。

需自备的仪器和用品:

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。

试剂组成和配制:

试剂一:液体 60 mL×1 瓶,4℃保存;

试剂二:液体 6 mL×1 瓶,4℃保存;

试剂三:液体 6 mL×1 瓶,4℃保存;

试剂四:粉剂×1 瓶,4℃保存,用时加入 25 mL 蒸馏水,溶解后 4℃保存一周;

试剂五:粉剂×1 瓶,4℃保存,用时加入 25 mL 蒸馏水,溶解后 4℃保存一周;

试剂六:液体 25mL×1 瓶,室温保存;

试剂七:10mmol/L 标准磷贮备液 10mL×1 瓶,4℃保存。

0.5 μ mol/mL 标准磷应用液配制:将试剂七 20 倍稀释,即取 0.1mL 试剂七加 1.9mL 蒸馏水充分混匀。

定磷剂的配制:按 H₂O:试剂四:试剂五:试剂六=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。

注意:配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器,也可以用一次性塑料器皿,避免磷污染。

样品酶液的制备:

1、组织样品:按照组织质量(g):试剂一体积(mL)为 1:5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织,加入 1mL 试剂一),进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

2、血清(浆)样品:直接检测。

操作步骤

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 660nm。

2、酶促反应(在 EP 管中加入下列试剂)

	对照管	测定管
试剂二 (μ L)		100
样本 (μ L)		100
混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 准确水浴 10min		
试剂三 (μ L)	100	100
试剂二 (μ L)	100	
样本 (μ L)	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	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/ml 标准磷应用液 (μL)		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：

- 1、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。
- 2、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。
- 3、空白管和标准管只要做一管。每个测定管设一个对照管。

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。

$$P5CS \text{ 活力 } (\mu\text{mol/h/mL}) = C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div V \text{ 样} \div T = 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

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。

$$P5CS \text{ 活力 } (\mu\text{mol/h /mg prot}) = C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \div T = 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div C_{pr}$$

（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。

$$P5CS \text{ 活力 } (\mu\text{mol/h /g 鲜重}) = C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

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。