

脯氨酸脱氢酶 (ProDH) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1094

产品规格: 100管/96样

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。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。

ProDH催化脯氨酸脱氢生成延丙酮酸, 脱下的氢通过吩嗪二甲酯硫酸 (PMS) 传递还原2,6-二氯酚靛酚 (DCPIP), 并且在600nm处具有特征吸收峰, 通过600nm吸光度的下降, 测定2,6-DCPIP的还原速度, 代表ProDH活性。

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。

试验中所需的仪器和试剂:

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、丙酮、匀浆器/研钵、冰、蒸馏水。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体100mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体1.2mL×1支	2-8℃
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1瓶	-20℃

溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前加入2.5mL蒸馏水充分溶解待用, 用不完的试剂4℃保存;
2. 试剂三: 临用前加入4mL蒸馏水充分溶解待用, 用不完的试剂4℃保存;
3. 试剂四: 临用前加入5mL蒸馏水充分溶解待用, 用不完的试剂可分装-20℃保存, 避免反复冻融。
4. 工作液的配制: 首先将试剂三和试剂四配成溶液, 临用前根据用量按照试剂一 (V): 试剂二 (V): 试剂三 (V) = 1.6 (mL): 0.2 (mL): 0.15 (mL) 的比例充分混匀。(注意: 现配现用, 用多少配多少)

操作步骤 (仅供参考):

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): 提取液一 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液一), 进行冰浴匀浆, 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, 15000g 4℃ 离心 20min, 取上清置冰上待测。
2. 细胞或细菌: 按照细胞数量 (10⁴ 个): 提取液一 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 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, 15000g 4℃ 离心 20min, 取上清置冰上待测。

二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 波长调至 600nm, 分光光度计蒸馏水调零。
2. 工作液置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 水浴 5min。
3. 加样表 (在微量玻璃比色皿/96 孔板中分别加入下列试剂)

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
工作液	160	160



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

试剂四	20	20
样本	20	-
蒸馏水	-	20

在微量玻璃比色皿/96孔板中分别加入上述试剂，充分混匀后于600nm处测定10s时的吸光值，迅速置于37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）水浴3min，拿出迅速擦干测定190s时的吸光值（有控温功能的酶标仪可以将温度设置为25℃或者37℃），空白管10s和190s的吸光度分别记为A1、A2，测定管10s和190s的吸光度记为A3、A4。计算 $\Delta A_{测定} = A3 - A4$ ， $\Delta A_{空白} = A1 - A2$ ， $\Delta A = \Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}$ （空白管只需做1-2次）。

二、ProDH 酶活计算

A、按微量玻璃比色皿计算

1. 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每分钟每mg组织蛋白在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 333.33 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算：

单位定义：每分钟每g组织在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/g 质量)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 333.33 \times \Delta A \div W$$

3. 按细胞数量计算：

单位定义：每分钟每1万个细胞在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.67 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积，0.2mL；V样：加入样本体积，0.02mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，3min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：500万个细胞。

B、按96孔板计算

1. 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每分钟每mg组织蛋白在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.005为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 666.67 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算：

单位定义：每分钟每g组织在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.005为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/g 质量)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 666.67 \times \Delta A \div W$$

3. 按细胞数量计算：

单位定义：每分钟每1万个细胞在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.005为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.33 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积，0.2mL；V样：加入样本体积，0.02mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，3min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：500万个细胞。

注意事项：

- ΔA 大于0.6时或者A3大于1.5时建议将样本上清用蒸馏水稀释后再进行测定。
- 控制A3在0.8以上（96孔板在0.4以上），若A3小于0.8（用96孔板数值小于0.4时），建议将样本上清用蒸馏水稀释后再进行测定。
- 空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过0.02。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com