吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS）活性检测试剂盒
（紫外分光光度法）

产品货号： BA1968

产品规格： 50T/48S

产品简介：

在干旱、盐渍化、重金属、紫外线等不同的胁迫条件下，均会诱导植物体内脯氨酸的积累，对植物起到保护作用。高等植物中，脯氨酸的合成有两条途径，分别以谷氨酸和鸟氨酸为前体。谷氨酸途径主要负责胁迫条件下脯氨酸的积累，而鸟氨酸途径主要在氮充足条件下起作用，与胁迫情况下脯氨酸的积累没有关系。

吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS）是脯氨酸的谷氨酸合成途径中的关键酶，P5CS是一个双功能酶，在NADPH和ATP作用下，可催化谷氨酸磷酸化及谷氨酸γ-半醛还原，通过测定NADPH在340nm处吸光度的变化，可计算出P5CS的活性高低。

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。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体60mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体0.6mL×1瓶	-20℃
试剂一	液体40mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体6mL×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×2瓶	-20℃
试剂四	粉剂×2瓶	-20℃

溶液的配制：

1. 试剂三：临用前加入2.5mL蒸馏水溶解，现配现用，-20℃分装保存，-20℃保存一周；
2. 试剂四：临用前每瓶加入3mL蒸馏水溶解，现配现用，-20℃分装保存，-20℃保存一周。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、1mL石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水、EP管。

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）

组织样本：按质量（g）：提取液体积（mL）1：5~10比例（建议称取0.1g样本，加入1.0mL提取液一）加入提取液一，再加入10μL提取液二，冰浴匀浆后于4℃，8000rpm，离心15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 将试剂三、试剂四置于冰上待测。
3. 操作表（在1mL石英比色皿中操作）：

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

试剂名称（μL）	空白管	测定管
蒸馏水	100	-
样本	-	100
试剂一	600	600
试剂二	100	100
试剂三	100	100
试剂四	100	100
在1mL石英比色皿中分别加入上述试剂，充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于37℃水浴锅/37℃培养箱放置5min，拿出迅速擦干测定5min 10s时的吸光值A2，计算ΔA测定管= A1测定-A2测定，ΔA空白管=A1空白-A2空白，ΔA=ΔA测定管-ΔA空白管。		

注意：空白管只需测定1-2次。

三、P5CS酶活计算

1. 按样本蛋白浓度计算

   酶活单位定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗1nmol NADPH为一个酶活单位。

   P5CS 酶活（U/mg prot）=ΔA÷ε÷d×V反总×10^9÷(V样×Cpr)÷T =321.54×ΔA÷Cpr

2. 按样本质量计算

   酶活单位定义：每克组织每分钟消耗1nmol NADPH为一个酶活单位。

   P5CS 酶活（U/g质量）= ΔA÷ε÷d×V反总×10^9÷(W×V 样÷V样总)÷T =324.76×ΔA÷W

ε：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，0.001L；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；V样：加入反应体系中上清液体积，0.1mL；V样总：加入提取液体积，1.01mL；W：样本质量，g；T：反应时间，5min；10^9：单位换算系数，1mol=10^9nmol。

注意事项：

1. 当A1测定高于1.2或者ΔA大于0.5时，建议将样本稀释后检测，并在计算公式中乘以稀释倍数。
2. 尽量使用新鲜样本进行检测，操作时请置于冰上操作。
3. ΔA空白管的数值一般不超过0.05。

实验实例：

1. 取 0.1g 三叶草进行样本处理，样本稀释 2 倍，按照测定步骤操作，计算得ΔA 测定管= A1 测定-A2 测定=0.923- 0.895=0.028，ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.667-0.659=0.008，ΔA=ΔA 测定管-ΔA 空白管=0.02，按照样本质量计算酶活得：

   P5CS 酶活（U/g 质量）=324.76×ΔA÷W×稀释倍数=129.9 U/g 质量。

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