

吡咯啉-5-羧酸还原酶 (P5CR) 活性检测试剂盒 (微量法)

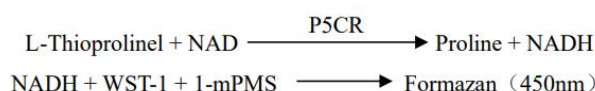
产品货号: BA2097

产品规格: 100T/48S

产品简介:

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。

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600μL×1支 | -20℃ |
| 试剂一 | 液体5mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂二 | 液体10mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂三 | 粉剂×1瓶 | -20℃ |
| 试剂四 | 液体4mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 标准品 | 粉剂×1支 | -20℃ |

溶液的配制:

- 提取液二: 易挥发试剂,用完及时拧盖封口放回-20℃。
- 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。
- 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。
- 标准品: 临用前加入1.4mL蒸馏水,即2μmol/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2μmol/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。

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)



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

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℃避光反应显色 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。

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

- (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。

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

- (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, 0.25μmol/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; 10³: 单位换算系数, 1μmol/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 ΔA_{测定} 大于 1，可以减少样品量或者缩短反应时间；若 ΔA_{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。



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