

吡咯啉-5-羧酸还原酶 (P5CR) 活性检测试剂盒

(可见分光光度法)

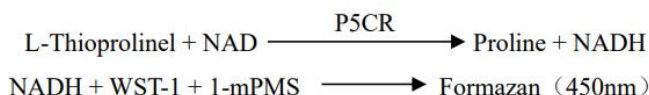
产品货号: BA2096

产品规格: 50T/24S

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(Thioproline)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30mL×1瓶	2-8°C
提取液二	液体300μL×1支	-20°C
试剂一	液体15mL×1瓶	2-8°C
试剂二	液体30mL×1瓶	2-8°C
试剂三	粉剂×1瓶	-20°C
试剂四	液体8mL×1瓶	2-8°C
标准品	粉剂×1支	-20°C

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°C。
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:临用前加入14mL试剂一,充分混匀。未用完的试剂分装保存,-20°C保存可以保存4周,避免反复冻融。
4. 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°C可以保存2周,避免反复冻融。临用前取50μL的2μmol/mL NADH标准液于EP管中,加入750μL蒸馏水充分溶解,配制成0.125μmol/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、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、分析天平、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、1mL玻璃比色皿、蒸馏水和冰。



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

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°C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 (10^4 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°C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. 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 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	450	450	450	450
试剂三	450	-	-	-
蒸馏水	-	450	450	550
试剂四	100	100	100	100
标准溶液	-	-	100	-
样品	100	100	-	-

充分混匀, 37°C避光反应显色 30min, 取 1000μL 于 1mL 玻璃比色皿中, 测定在 450nm 处的吸光度。记作 $A_{\text{测定}}$, $A_{\text{对照}}$, $A_{\text{标准}}$, $A_{\text{空白}}$ 。 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。(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。

$$\text{P5CR 活性 (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 4.167 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

(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。

$$\text{P5CR 活性 (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 4.167 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

(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。

$$\text{P5CR 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (500 \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 0.0083 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

(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。

$$\text{P5CR 活性 (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \times T \times 10^3 \times F = 4.167 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

$C_{\text{标准}}$: NADH 标准液的浓度, 0.125μmol/mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入的样本体积, 0.1mL; $V_{\text{样总}}$: 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, 1μmol/mL=10³nmol/mL; F : 样本稀释倍数。

注意事项:

1. 如果 $A_{\text{测定}}$ 大于 1.5 或者 $\Delta A_{\text{测定}}$ 大于 0.8, 可以减少样品量或者缩短反应时间; 若 $\Delta A_{\text{测定}}$ 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