

吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1087

保存：4℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细菌、真菌

产品简介

脯氨酸(Pro)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，逆境条件下，植物体内 Pro 含量显著增加。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。P5CS 在自然界中主要分布于植物和部分微生物中，是陆生植物适应逆境的核心酶之一。动物通常缺乏典型 P5CS，但无脊椎动物和某些真核微生物中仍存在功能类似物。本试剂盒提供了一种简单的检测方法，用于检测生物体内吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)活性，其原理是吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)催化谷氨酸生成吡咯啉-5-羧酸(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来测定 P5CS 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃保存
试剂二	6mL	12mL	4℃保存
试剂三	6mL	12mL	4℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃保存
试剂六	12.5mL	25mL	室温保存
标准品	1mL	1mL	4℃避光保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 660nm 处的吸光度）及恒温箱

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

制冰机、低温离心机

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂四：临用前配制，48T 加入 12.5mL 去离子水充分溶解，96T 加入 25mL 去离子水充分溶解。未用完的试剂可 4℃保存一周或分装后-20℃保存，避免反复冻融。

产品说明书

试剂五：临用前配制，48T 加入 12.5mL 去离子水充分溶解，96T 加入 25mL 去离子水充分溶解。未用完的试剂可 4℃ 保存一周或分装后 -20℃ 保存，避免反复冻融。

试剂六：即用型；使用前，平衡到室温；室温保存。

定磷剂的配制：配制比例按照 H₂O : 试剂四 : 试剂五 : 试剂六 = 2:1:1:1 的比例配制，配好的定磷试剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染（请根据需要，用多少配多少）。

注意：配试剂最好用新的玻璃器皿或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。

标准曲线设置：按下表所示用去离子水将 10mM 标准品稀释为 4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625mM 的标准溶液。

	标准品体积 (μL)	去离子水体积 (μL)	标准品浓度 (mM)
Std. 1	400μL 10mM	600	4
Std. 2	100μL of Std. 1	100	2
Std. 3	100μL of Std. 2	100	1
Std. 4	100μL of Std. 3	100	0.5
Std. 5	100μL of Std. 4	100	0.25
Std. 6	100μL of Std. 5	100	0.125
Std. 7	100μL of Std. 6	100	0.0625

样本制备

组织或真菌子实体：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 试剂一，冰浴匀浆，8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液置冰上待测。

细菌或可进行计数的真菌：收集 500 万细菌或真菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细菌或真菌，离心后弃上清，加入 1mL 试剂一，冰浴超声波破碎细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。然后 8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液置冰上待测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在 -80℃ 保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 Bradford 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

- 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 660nm，可见分光光度计去离子水调零。
- 酶促反应（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

	空白管 (μL)	标准管 (μL)	测定管 (μL)	对照管 (μL)
试剂二	0	0	100	0
样本	0	0	100	0

混匀后盖紧，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确孵育 10min

试剂三	0	0	100	100
试剂二	0	0	0	100
样本	0	0	0	100

混匀，8000g，25℃ 离心 10min，取上清液

- 定磷（在 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入下列试剂）

上清	0	0	20	20
----	---	---	----	----

产品说明书

不同浓度标准品	0	20	0	0
去离子水	20	0	0	0
定磷试剂	200	200	200	200

混匀，室温静置 30min，测定 660nm 吸光值。计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。

注意：1. 所用容器要求严格无磷。

2. 空白和标准曲线只需做 1 次，每个测定设一个对照。

3. 为保证实验结果的准确性，需先取 1-2 个样做预实验，如果测定的吸光值过高（高于 2.0）可用试剂一稀释样本后再测定，计算结果时注意乘以稀释倍数。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. 无机磷（Pi）含量的计算

将 $\Delta A_{\text{测}}$ 带入方程得到 y 值（mM）。

3. P5CS 活性计算

（1）按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

P5CS 活性 (U/g 鲜重) = $(y \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T = 200 \times y \div W$

（2）按细菌或真菌数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或真菌在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位

P5CS 活性 (U/ 10^4 cell) = $(y \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T = 0.4 \times y$

（3）按样本蛋白浓度计算

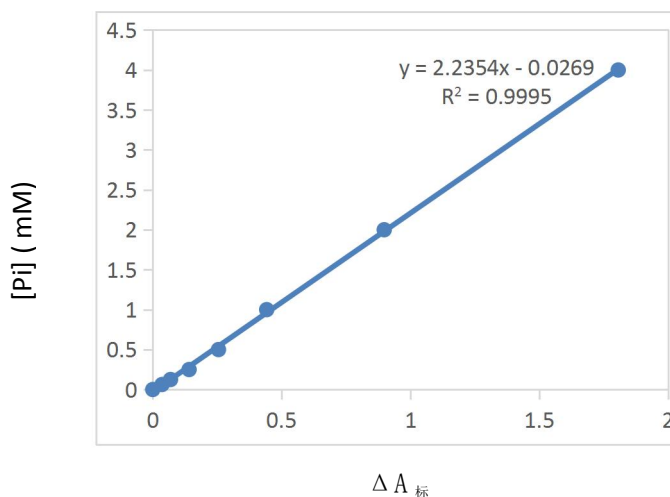
单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

P5CS 活性 (U/mg prot) = $(y \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 200 \times y \div Cpr$

$V_{\text{酶促}}$ ：酶促反应体系总体积， 2×10^{-4} L； 10^6 ：单位换算系数， $1\text{mmol} = 10^6\text{nmol}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.1mL； $V_{\text{提取}}$ ：加入试剂一体积，1mL；T：反应时间，10min；W：样本重量，g；500：细胞总数，500 万；cpr：样本蛋白浓度，mg/mL。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

- 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
- 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。

产品说明书

3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1046 脯氨酸（PRO）检测试剂盒（微量法）

PMK1090 半胱氨酸（Cys）检测试剂盒（微量法）

PMK1093 赖氨酸（LYS）检测试剂盒（微量法）

PMK1814 谷氨酸脱羧酶（GAD）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

