

# 脯氨酸脱氢酶（ProDH）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10648

规格：100T/96S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 100 mL×1 瓶	4°C保存
提取液二	液体 1.2 mL×1 支	4°C保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4°C保存；
- 2、试剂三：临用前加入 4 mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4°C保存；
- 3、试剂四：临用前加入 5 mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂可分装-20°C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）

## 产品说明：

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。**

## 需自备的仪器和用品：

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。

## 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）：提取液一体积（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°C离心 15min，取上清液于一支新的 EP 管中，加入 10μL 提取液二，涡旋混匀，冰浴放置 30min 后，15000g 4°C离心 20min，取上清置冰上待测。

2、细胞或细菌：按照细胞数量（10<sup>4</sup>个）：提取液一体积（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 10μL 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
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）。

## 三、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：

1.  $\Delta A$ 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。
2. 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。
3. 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。

### 实验实例：

- 1、取 0.1g 稗草加入 1mL 提取液一进行匀浆研磨，对样本进行处理，取上清稀释 2 倍，之后按照测定步骤操作，用微量玻璃比色皿测得计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_3 - A_4 = 0.8549 - 0.4798 = 0.3751$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A_1 - A_2 = 0.8941 - 0.8813 = 0.0128$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}} = 0.3751 - 0.0128 = 0.3623$ ，按样本质量计算酶活得：  
 $\text{ProDH (U/g 质量)} = 333.33 \times \Delta A \div W \times \text{稀释倍数} = 333.33 \times 0.3623 \div 0.1 \times 2 = 2415.309 \text{ U/g 质量}$ 。
- 2、取 0.1g 兔子肾脏组织加入 1mL 提取液一进行匀浆研磨，对样本进行处理，取上清后按照测定步骤操作，用微量玻璃比色皿测得计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_3 - A_4 = 0.9369 - 0.6631 = 0.2738$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A_1 - A_2 = 0.8941 - 0.8813 = 0.0128$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}} = 0.2738 - 0.0128 = 0.261$ ，按样本质量计算酶活得：  
 $\text{ProDH (U/g 质量)} = 333.33 \times \Delta A \div W = 333.33 \times 0.261 \div 0.1 = 869.99 \text{ U/g 质量}$ 。