

## 吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 检测试剂盒 (微量法)

**注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**

### 测定意义：

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,  $\Delta$  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。

### 测定原理：

吡咯啉-5-羧酸合成酶催化谷氨酸生成 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可确定 P5CS 活性。

### 试剂组成和配制：

试剂一：液体 60 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 12 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：液体 12 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存，用时加入 25 mL 蒸馏水，溶解后 4℃ 保存一周；

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃ 保存，用时加入 25 mL 蒸馏水，溶解后 4℃ 保存一周；

试剂六：液体 25mL×1 瓶，室温保存；

试剂七：10mmol/L 标准磷贮备液 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

**0.5 $\mu$ mol/mL 标准磷应用液配制：**将试剂七 20 倍稀释，即取 0.1mL 试剂七加 1.9mL 蒸馏水充分混匀。

**定磷剂的配制：**按 H<sub>2</sub>O: 试剂四:试剂五:试剂六=2:1:1:1 的比例配制，配好的定磷剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂现用现配。

**注意：配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。**

### 样品酶液的制备：

1. **组织样品：**按照组织质量 (g)：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一），进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2. **血清（浆）样品：**直接检测。

### 测定操作：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 660nm。

2、酶促反应（在 EP 管中加入下列试剂）

	对照管	测定管
试剂二 ( $\mu$ L)		100
样本 ( $\mu$ L)		100

混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确水浴 10min

试剂三 (μL)	100	100
试剂二 (μL)	100	
样本 (μL)	100	

混匀, 8000g, 25℃离心 10min, 取上清液

3、定磷 (在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂)

	空白管	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/ml 标准磷应用液 (μL)		20		
上清液 (μL)			20	20
蒸馏水 (μL)	20			
定磷试剂 (μL)	200	200	200	200

混匀, 室温放置 30min, 在 660nm 处, 记录各管吸光值。

## 计算公式:

### 1、血清 (浆) P5CS 活力的计算:

单位定义: 每小时每毫升血清 (浆) 中 P5CS 消耗 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{P5CS 活力} (\mu\text{mol/h/mL}) &= C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div V \text{ 样} \div T \\ &= 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \end{aligned}$$

### 2、组织中 P5CS 活力的计算:

#### (1) 按蛋白浓度计算:

单位定义: 每小时每毫克组织蛋白中 P5CS 消耗 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{P5CS 活力} (\mu\text{mol/h /mg prot}) &= C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (Cpr \times V \\ &\quad \text{样}) \div T \\ &= 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr \end{aligned}$$

#### (2) 按样本鲜重计算:

单位定义: 每小时每克组织中 P5CS 消耗 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{P5CS 活力} (\mu\text{mol/h /g 鲜重}) &= C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (W \times V \\ &\quad \text{样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

C 标准管: 标准管浓度, 0.5μmol/mL;

V 总: 酶促反应总体积, 0.3mL;

V 样: 加入样本体积, 0.1mL ;

V 样总: 加入提取液体积, 1mL;

T: 反应时间, 1/6 小时;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

W: 样本鲜重, g。

## 注意事项:

- 1、由于每一个样都必须做对照, 本试剂盒 100 管保证测 48 份 P5CS 活性。
- 2、此法具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管要求严格无磷。
- 3、空白管和标准管只要做一管。每个测定管设一个对照管。