

脯氨酸脱氢酶（ProDH）检测试剂盒（分光光度法）

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：

ProDH 是存在于线粒体内的催化脯氨酸降解的关键酶。脯氨酸是分布最广泛的一种渗透物质，在胁迫条件下很多植物可以通过增加合成、减少降解而在体内累积大量脯氨酸，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。

测定原理：

利用异硫氰酸甲酯检测 ProDH 催化的脱氢反应，600nm 处吸光值的吸光值的变化反映酶活性的高低。

试剂组成和配制：

提取液：60mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 2 mL×1 支，4℃ 保存；

试剂二：液体 50 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 8mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4℃ 保存；

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 8mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4℃ 保存；

试剂五：粉剂×5 支，4℃ 保存；

粗酶液提取：

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 样本，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆，1500g 4℃ 离心 15min，取上清液于一支新的 EP 管中，加入一滴试剂一（用 10μL 的枪头加入），涡旋混匀，冰浴放置 30min 后，16000g 4℃ 离心 20min，取上清置冰上待测。

测定步骤:

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 600nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定
 - (1) **混合液的配制**：首先将试剂三和试剂四配成溶液（见试剂的组成和配制），临用前根据用量按照试剂二（V）：试剂三（V）：试剂四（V）=7.2（mL）：0.9（mL）：0.9（mL）的比例充分混匀。（**注意：现配现用，用多少配多少**），置于 30℃水浴 5min；
 - (2) 试剂五的配制：取试剂五一支，临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用，现配现用。
 - (3) 1mL 玻璃比色皿中加入 175μL 样本、75μL 试剂五和 750μL 混合液，混匀，立即记录 600nm 处初始吸光值 A1 和 10min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

ProDH 活性计算:

(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。

$$\begin{aligned}\text{ProDH (U/mg prot)} &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.01 \div T \\ &= 57.14 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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。

$$\begin{aligned}\text{ProDH (U/g 鲜重)} &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T \\ &= 57.14 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，1mL；

V 样：加入样本体积，0.175mL；

V 样总：加入提取液体积，1 mL；

T：反应时间，10 min；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；

W：样本质量，g。