

吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS）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：

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 6 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：液体 6 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 μ 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 H₂O: 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。

测定步骤：

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（ μ L）		100
样本（ μ 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）		100		
上清液（μL）			100	100
蒸馏水（μL）	100			
定磷试剂（μL）	1000	1000	1000	1000

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。

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

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。

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

(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。

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

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 50 管保证测 24 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。