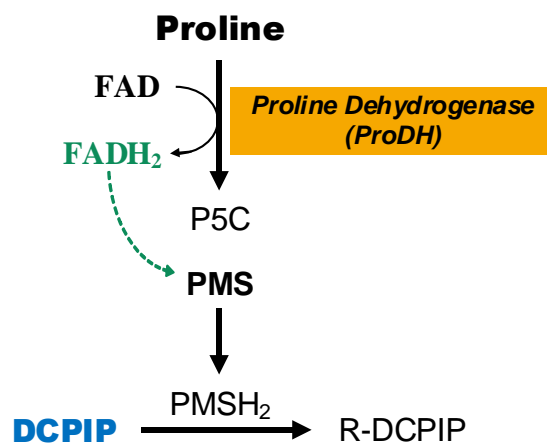




脯氨酸脱氢酶 (ProDH) 活性检测试剂盒
Proline Dehydrogenase (ProDH) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



脯氨酸脱氢酶 (ProDH) 活性检测试剂盒

Proline Dehydrogenase (ProDH) Activity Assay Kit

一、产品描述

脯氨酸脱氢酶 (ProDH) 是存在于线粒体内催化脯氨酸降解的关键酶, 在氨基酸合成和降解过程中起着关键的调节作用, 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。

脯氨酸脱氢酶催化脯氨酸过程中产生的氢可通过吩嗪二甲酯硫酸 (PMS) 传递还原 2,6-二氯酚靛酚 (DCPIP), DCPIP 在 600nm 处具有特征吸收峰, 通过测定 600 nm 处吸光度的下降速率即可表征脯氨酸脱氢酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液 A	液体 100 mL×1 瓶	4°C 保存	-
提取液 B	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	使用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解
试剂三	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 4 mL 蒸馏水充分溶解
试剂四	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 5 mL 蒸馏水充分溶解 (可分装后-20°C 保存, 避免反复冻融)
工作液的制备 (现用现配): 使用前根据使用量按照试剂一: 试剂二: 试剂三=32:4:3 的体积比配制, 充分混匀即为工作液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿 (光径 10 mm) /96 孔板、研钵/匀浆器、台式离心机、可调式移液器/多道移液器、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备 (可根据预实验结果适当调整样本量及比例)

① 细胞或细菌: 离心收集细菌或细胞至离心管内, 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液 A 体积 (mL) 为 (500-1000): 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液 A) 处理样品, 冰浴匀浆, 4°C 1500 g 离心 15 min, 弃沉淀, 留上清; 上清中加入 10 μ L 提取液 B, 涡旋混匀, 冰浴放置 30 min, 4°C 15000 g 离心 20 min, 取上清置于冰上待测。

②组织：按照组织质量 (g)：提取液 A 体积 (mL) 为 1：(5-10) 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴匀浆，4°C 1500 g 离心 15 min，弃沉淀，留上清；上清中加入 10 μL 提取液 B，涡旋混匀，冰浴放置 30 min，4°C 15000 g 离心 20 min，取上清置于冰上待测。

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 600 nm，蒸馏水调零。

②试验前将工作液 37°C（哺乳动物）或 25°C（其他物种）预热 5 min。

③在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
工作液	160	160
试剂四	20	20
粗酶液	20	-
蒸馏水	-	20

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 600 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）恒温准确反应 180 s，测定 190 s（总时间）时 600 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.脯氨酸脱氢酶（ProDH）活性计算

3.1 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟在每 mL 反应体系中使 600 nm 处吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}}}{0.01 \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{333.33 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟在每 mL 反应体系中使 600 nm 处吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}}}{0.01 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{333.33 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个每分钟细胞在每 mL 反应体系中使 600 nm 处吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}}}{0.01 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{333.33 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

3.2 使用 96 孔板测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟在每 mL 反应体系中使 600 nm 处吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}}}{0.005 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{666.67 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟在每 mL 反应体系中使 600 nm 处吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}}}{0.005 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{666.67 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个每分钟细胞在每 mL 反应体系中使 600 nm 处吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}}}{0.005 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{666.67 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积，0.2 mL；T：反应时间，180 s = 3 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计。

四、注意事项

- ①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；
- ② ΔA 大于 0.6 或 A1 测定大于 1.2 时，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ③准确在 10 s 和 190 s 处完成读数，以保证实验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔板应使用多道移液器且分批进行检测，以确保组间反应时间一致。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

