

脯氨酸 (PRO) 含量测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

Pro 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 逆境条件下, 植物体内 Pro 含量显著增加。Pro 增加量在一定程度上反映了抗逆性, 抗旱性强的品种往往积累较多的脯氨酸。因此, 脯氨酸增加量可以作为抗逆育种的生理指标之一。

测定原理:

用磺基水杨酸 (SA) 提取 Pro, 加热处理后, Pro 与酸性茚三酮溶液反应生成红色; 加甲苯萃取后, 在 520nm 测定吸光度。

组成:

| 产品名称 | SR016-100T/96S | Storage |
|---------------|----------------|---------|
| 提取液: 液体 | 100ml | 4°C |
| 试剂一: 冰乙酸 (自备) | 25ml | 4°C |
| 试剂二: 液体 | 25ml | 4°C |
| 试剂三: 甲苯 (自备) | 50ml | 4°C |
| 说明书 | 一份 | |

自备仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、冰乙酸 25ml、甲苯 50ml、研钵、冰和蒸馏水。

样品测定的准备:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (ml) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1ml 提取液), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 之后置 95°C 水浴振荡提取 10min; 10000g, 25°C 离心 10min, 取上清, 冷却后待测。

组织: 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 组织, 加入 1ml 提取液), 匀浆; 之后置 95°C 水浴振荡提取 10min; 10000g, 25°C 离心 10min, 取上清, 冷却后待测。



2、血清（浆）样品：按照血清（浆）体积（ml）：提取液体积(ml)为 1: 5~10 的比例（建议取 0.1ml 血清（浆）加入 1ml 提取液），充分混匀，之后置 95°C 水浴振荡提取 10 分钟，10000g，25°C 离心 10 分钟，取上清，冷却后待测。

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 520nm，蒸馏水调零。

2、样本测定：

(1) 取 0.25ml 样本+0.25ml 试剂一+0.25ml 试剂二 于有盖 EP 管中，置 95°C 水浴中保温 30min（盖紧，防止水分散失），每 10min 振荡一次。

(2) 待冷却后，加入 0.5ml 试剂三，振荡 30s，静置片刻，使色素转至试剂三中；吸取 0.2ml 上层溶液于微量石英比色皿或 96 孔板中，于 520nm 波长处比色，记录吸光值 A。

Pro 含量计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、典型回归方程 $y = 0.0521x - 0.0021$ （x 为脯氨酸含量， $\mu\text{g/ml}$ ；y 为吸光值 A）

2、按照血清（浆）体积计算

Pro 含量($\mu\text{g/ml}$)= $[(A+0.0021) \div 0.0521 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 192 \times (A+0.0021)$

3、按照蛋白浓度计算

Pro 含量($\mu\text{g/mg prot}$)= $[(A+0.0021) \div 0.0521 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 19.2 \times (A+0.0021) \div Cpr$

4、按照样本质量计算

Pro 含量($\mu\text{g/g 鲜重}$)= $[(A+0.0021) \div 0.0521 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 19.2 \times (A+0.0021) \div W$

5、按照细菌或细胞密度计算

Pro 含量($\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}$)= $[(A+0.0021) \div 0.0521 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0384 \times (A+0.0021)$

V1: 加入反应体系中样本体积，0.25ml；V2: 加入提取液体积，1 ml；V3: 加入血清（浆）体积，0.1 ml；

Cpr: 样本蛋白质浓度，mg/ml；W: 样本质量，g；500: 细菌或细胞总数，500 万。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

1、典型回归方程 $y = 0.02605x - 0.0021$ （x 为脯氨酸含量， $\mu\text{g/ml}$ ；y 为吸光值 A）

2、按照血清（浆）体积计算

Pro 含量($\mu\text{g/ml}$)= $[(A+0.0021) \div 0.02605 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 384 \times (A+0.0021)$

3、按照蛋白浓度计算

Pro 含量($\mu\text{g/mg prot}$)= $[(A+0.0021) \div 0.02605 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 38.4 \times (A+0.0021) \div Cpr$

4、按照样本质量计算

Pro 含量($\mu\text{g/g 鲜重}$)= $[(A+0.0021) \div 0.02605 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 38.4 \times (A+0.0021) \div W$

3、按照细菌或细胞密度计算

Pro 含量($\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}$)= $[(A+0.0021) \div 0.02605 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0769 \times (A+0.0021)$

V1: 加入反应体系中样本体积，0.25ml；V2: 加入提取液体积，1 ml；V3: 加入血清（浆）体积，0.1 ml；

Cpr: 样本蛋白质浓度，mg/ml；W: 样本质量，g；500: 细菌或细胞总数，500 万。

注意：最低检测限为 $1\mu\text{g/ml}$ 或 $1\mu\text{g/g 鲜重}$ 或 $0.01\mu\text{g/mg prot}$

