

# 吡咯啉-5-羧酸还原酶（P5CR）活性检测试剂盒

## （可见分光光度法）

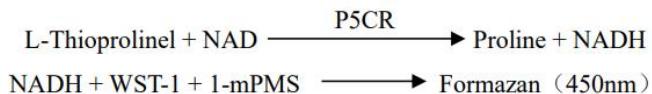
产品货号：BA2096

产品规格：50T/24S

### 产品简介：

吡咯啉-5-羧酸还原酶(pyrroline-5-carboxylate reductase, P5CR)是广泛存在于原核和真核生物中的一种重要的管家蛋白。在NAD(P)H 的作用下，吡咯啉-5-羧酸(P5C)在吡咯啉-5-羧酸还原酶作用下转化为脯氨酸，并且P5CR还被发现能够在大肠杆菌中参与到硫代脯氨酸(Thioproline)的代谢过程。

硫代脯氨酸在吡咯啉-5-羧酸还原酶催化作用下脱氢，并伴随着NAD转化为NADH。在1-mPMS作用下，WST-1可与NADH反应，产生水溶性formazan，在450nm下有特征吸收峰。



注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体30mL×1瓶	2-8°C
提取液二	液体300μL×1支	-20°C
试剂一	液体15mL×1瓶	2-8°C
试剂二	液体30mL×1瓶	2-8°C
试剂三	粉剂×1瓶	-20°C
试剂四	液体8mL×1瓶	2-8°C
标准品	粉剂×1支	-20°C

### 溶液的配制：

- 提取液二：易挥发试剂，用完及时拧盖封口放回-20°C。
- 提取液的配制：根据样本量按提取液一：提取液二=0.99mL: 0.01mL (1T) 的比例配制提取液，现用现配，禁止提前配制。
- 试剂三：临用前加入14mL试剂一，充分混匀。未用完的试剂分装保存，-20°C保存可以保存4周，避免反复冻融。
- 标准品：临用前加入1.4mL蒸馏水，即2μmol/mL NADH标准液。未用完的试剂分装保存，-20°C可以保存2周，避免反复冻融。临用前取50μL的2μmol/mL NADH标准液于EP管中，加入750μL蒸馏水充分溶解，配制成0.125μmol/mL的NADH标准液。现用现配。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、分析天平、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、1mL 玻璃比色皿、蒸馏水和冰。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

**操作步骤：**
**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

- 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)进行冰浴匀浆。8000g 4°C离心10min，取上清，置冰上待测。
- 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<sup>4</sup>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200W，超声3s，间隔10s，重复30次)；8000g 4°C离心10min，取上清，置冰上待测。
- 血清(浆)等液体：直接测定。(若溶液呈现浑浊，则离心取上清后再测定)。

**二、测定步骤**

- 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至450nm，蒸馏水调零。
- 操作表：

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
试剂二	450	450	450	450
试剂三	450	-	-	-
蒸馏水	-	450	450	550
试剂四	100	100	100	100
标准溶液	-	-	100	-
样品	100	100	-	-

充分混匀，37°C避光反应显色30min，取1000μL于1mL玻璃比色皿中，测定在450nm处的吸光度。记作A<sub>测定</sub>，A<sub>对照</sub>，A<sub>标准</sub>，A<sub>空白</sub>。ΔA<sub>测定</sub>=A<sub>测定</sub>-A<sub>对照</sub>，ΔA<sub>标准</sub>=A<sub>标准</sub>-A<sub>空白</sub>。（标准管和空白管只需做1-2次。）

**三、P5CR活性计算**
**(1) 按样本蛋白浓度计算：**

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟催化产生1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{P5CR活性 (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 4.167 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

**(2) 按样本质量计算：**

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{P5CR活性 (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 4.167 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

**(3) 按细菌或细胞数目计算**

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟催化产生1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{P5CR活性 (U/10}^4 \text{ cell}) = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (500 \div V_{\text{总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 0.0083 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

**(4) 按血清(浆)等液体体积计算**

单位的定义：每mL血清(浆)等液体每分钟催化产生1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{P5CR活性 (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3 \times F = 4.167 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

C<sub>标准</sub>: NADH标准液的浓度，0.125μmol/mL；V<sub>样</sub>: 反应体系中加入的样本体积，0.1mL；V<sub>总</sub>: 加入的提取液体积，1mL；T: 反应时间，30min；C<sub>pr</sub>: 蛋白质浓度，mg/mL；W: 样本质量，g；500: 细胞或细菌数目，500万；10<sup>3</sup>: 单位换算系数，1μmol/mL=10<sup>3</sup>nmol/mL；F: 样本稀释倍数。

**注意事项：**

- 如果A<sub>测定</sub>大于1.5或者ΔA<sub>测定</sub>大于0.8，可以减少样品量或者缩短反应时间；若ΔA<sub>测定</sub>小于0.01，可以加大样品量或者延长反应时间至1h或者更长时间。计算公式注意同步修改。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com