

脯氨酸(Pro)含量试剂盒说明书

(货号: PB1007W96 微量法 96样)

有效期: 3个月

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。

需自备的仪器和用品:

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、甲苯、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4℃保存。

试剂一: 冰乙酸 30 mL×1 瓶, 4℃保存。(自备)

试剂二: 液体 30 mL×1 瓶, 4℃保存。

试剂三: 甲苯 60mL×1 瓶, 4℃保存。(自备)

标准品: 粉剂×1 支, 4℃保存; 使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 10 mg/mL 标准液)

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(10⁴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℃水浴振荡提取 10min; 10000g, 25℃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), 进行冰浴匀浆; 之后置 95℃水浴振荡提取 10min; 10000g, 25℃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 0.9mL 提取液), 充分混匀, 之后置 95℃水浴振荡提取 10 分钟, 10000g, 25℃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、标准曲线的制备: 将 10 mg/mL 标准液使用蒸馏水稀释至 30、20、10、5、2.5、1.25、0.5、0μg/mL 即为标准稀释液。



编号	A	B	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{g/mL}$)	10000	1000	30	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0
稀释前标准品浓度($\mu\text{g/mL}$)	1000	100	100	100	100	10	5	2.5	1.25	1.25
标准液体积(μL)	100	100	300	200	100	500	500	500	500	0
蒸馏水体积(μL)	900	900	700	800	900	500	500	500	500	1000

3、在 EP 管中加入下列试剂

试剂(μL)	测定管	标准管
样本	250	
标准品		250
试剂一	250	250
试剂二	250	250
置 95℃ 水浴中保温 30min (盖紧, 防止水分散失), 每 10min 振荡一次, 反应结束后冷却至室温		
试剂三	500	500
振荡 30s, 静置 10min, 使色素转至试剂三中		

吸取 200 μL 上层溶液于微量石英比色皿或 96 孔板中, 测定 520nm 处吸光值, 记为 A 测定、A 标准; 计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 标准 ($0\mu\text{g/mL}$), ΔA 标准 = A 标准 - A 标准 ($0\mu\text{g/mL}$)。

Pro 含量计算公式:

标准曲线的绘制以各标准溶液浓度为 x 轴, 以其对应的吸光值 (ΔA 标准) 为 y 轴, 绘制标准曲线,

得到标准方程 $y=kx+b$, 将 ΔA 测定带入公式中得到 x ($\mu\text{g/mL}$)。

1、按照血清 (浆) 体积计算

Pro 含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $x \times (V1+V2) \div V2 = 10 \times x$

2、按照蛋白浓度计算

Pro 含量 ($\mu\text{g/mg prot}$) = $x \div C_{pr}$

3、按照样本质量计算

Pro 含量 ($\mu\text{g/g 鲜重}$) = $x \times V_{\text{样总}} \div W = x \div W$

4、按照细菌或细胞密度计算

Pro 含量 ($\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}$) = $x \times V_{\text{样总}} \div 500 = 0.002 \times x$

V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; V1: 血清 (浆) 样品加入提取液体积, 0.9 mL; V2: 加入血清 (浆) 体积, 0.1 mL; C_{pr}: 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。

注意事项

①提取液中含有蛋白沉淀剂, 若采用蛋白浓度计算结果, 需单独使用 PBS 提取后再测定蛋白浓度;

②若 A 测定或 ΔA 测定超出标准吸光值线性范围: 高于最高值建议将待测样本使用提取液适当稀释后再进行测定, 低于最低值建议适当调整样本量和比例重新提取后再进行测定, 计算时相应修改。