1-吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)活性检测试剂盒说明书

(NADPH 氧化速率法)

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：

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。

1-吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS，Δ1-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：

1-吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)是脯氨酸的谷氨酸合成途径中的关键酶，P5CS 是一个双功能酶，在 NADPH 和 ATP 作用下，可催化谷氨酸磷酸化及谷氨酸γ-半醛还原，通过测定 NADPH 在 340 nm 处吸光度的变化，可计算出 P5CS 的活性高低。

Glutamate + Glutamate Gamma- Semialdehyde + NADPH(340nm) + ATP $\xrightarrow{\text{P5CS}}$ Compound

试剂组成和配制：

产品名称	AC024-100T/96S	Storage
提取液一：液体	110mL	4℃避光
提取液二：液体	1mL	-20℃避光
试剂一：液体	15mL	4℃
试剂二：粉剂	1 瓶	-20℃

最终解释权所有 © 伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司，保留一切权利

试剂三：粉剂	1 瓶	-20℃避光
试剂四：粉剂	3 支	-20℃避光
说明书	一份	

试剂二临用前加入 3mL 蒸馏水充分溶解，现配现用(-20℃分装保存时间：7 天)；

试剂三临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解，现配现用(-20℃分装保存时间：7 天)；

试剂四临用前取一支加入 833μL 蒸馏水充分溶解，现配现用(-20℃分装保存时间：7 天)；

需自备仪器和用品：

天平、酶标仪、**96 孔 UV 板**、低温离心机、恒温水浴锅、涡旋仪、可调式移液器、实验室计时器、EP 管、匀浆器/研钵/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

样本处理：

1、组织：按照组织质量(g)：提取液一体积(mL)为 1：5~10 的比例(建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液)，进行冰浴匀浆，加入 10μL 提取液二，8000rpm 4℃离心 15min，弃去沉淀，取上清置冰上待测。

测定步骤：

1、 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

2、 在 96 孔 UV 板中依次加入下列试剂：

试剂名称(μL)	空白管	测定管
蒸馏水	20	-
样本	-	20
试剂一	120	120
试剂二	20	20
试剂三	20	20
试剂四	20	20
充分混匀后于 340nm 处测定 10s 时的吸光值，迅速置于 37℃(哺乳动物)或 25℃(其他物种)水浴 5min，拿出迅速测定吸光值，10s 的吸光值记为 A1 测定、A1 空白，5min 的吸光度记为 A2 测定、A2		

最终解释权所有 © 伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司，保留一切权利

空白。计算△A 测定=A1 测定-A2 测定，△A 空白=A1 空白-A2 空白。△A=△A 测定-△A 空白。注：空白管只测 1-2 次即可。

酶活性计算公式：

(1)按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADPH 为一个酶活单位。

P5CS(U/mg prot)=ΔA÷ε÷d×V 反总×10^9÷(V 样×Cpr) ÷T×F=535.91×ΔA÷Cpr×F

需要额外检测蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 法蛋白质含量测定试剂盒，货号：PDM005 PDM006

(2)按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol NADPH 为一个酶活单位。

P5CS(U/g 鲜重)=ΔA÷ε÷d×V 反总×10^9÷(W×V 样÷V 样总) ÷T×F =541.26×ΔA÷W×F

ε：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.6cm；V 反总：反应体系总体积，2×10^{-4}L；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，0.02mL；V 样总：加入提取液体积，1.01mL；W：样本质量，g；T：反应时间，5min；10^9：单位换算系数，1mol=10^9nmol；F：样本稀释倍数。

注意事项：

1. 按照说明书推荐的顺序，依次加入试剂。
2. 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 0.05。
3. 当 A1 测定 > 1.5 或者ΔA 测定 > 0.5 时，建议将样本稀释后检测，并在计算公式中乘以稀释倍数。
4. 尽量使用新鲜样本进行检测，操作时请置于冰上操作。
5. 准确在 10s 和 5 分钟处完成读数，以保证实验结果的准确性和重复性。

最终解释权所有 © 伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司，保留一切权利

6. 仅供研究使用。不得用于诊断程序。

7. 最低检出限：26.07 U/g 鲜重

实验实例：

样本检测：

样本	质量	A1 测定	A2 测定	ΔA 空白	ΔA 测定	U/g 鲜重
豆苗下胚轴	0.976g	0.963	0.737	0	0.226	125.3327

常见问题及解决方案：

问题	可能原因	解决方法
样品读数重复性差	样品类型不合适	参考说明书了解不兼容的样品类型
	组织样品匀浆不充分	延长超声时间/增加匀浆器的研磨次数
	样品反复冻融次数过多	将样品分装，不可反复冻融
	样品中含有干扰物质	排查干扰物质，必要时对样品进行脱蛋白处理
	样品读数超出线性范围	对样品进行浓缩或稀释，使读数处于线性范围内
	孔中有气泡	气泡会干扰读数，操作时尽量避免产生气泡，读数前务必去除气泡
样品和标准品读数偏低/偏高	样品放置时间过长或储存不当	使用新鲜制备的样品，按推荐温度保存至使用前
	试剂盒组分未完全解冻	待组分完全解冻后轻轻混匀再使用
	试剂在冰上放置时间过长	每次使用前新鲜配制反应混合液
	孵育时间/温度不当	参考说明书推荐的孵育时间和/或温度
	试剂加样量错误	检查移液枪是否校准(始终使用能吸取整体积的最小量程移液枪)；尽量避免吸取过小体积的试剂
	配制反应混合液时移液误差	始终配制混合母液

参考文献：

[1] Zheng, K., Sha, N., Hou, G. *et al.* IGF1R-phosphorylated PYCR1 facilitates ELK4 transcriptional activity and sustains tumor growth under hypoxia. *Nat Commun* **14**, 6117 (2023). https://doi.org/10.1038/s41467-023-41658-z

最终解释权所有 © 伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司，保留一切权利