



脯氨酸 (PRO) 含量测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、冰乙酸 50mL、甲苯 50mL、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 液体 50mL×1 瓶, 4℃保存。

试剂一: 冰乙酸 25 mL×1 瓶, 4℃保存。(自备)

试剂二: 液体 25 mL×1 瓶, 4℃保存。

试剂三: 甲苯 50mL×1 瓶, 4℃保存。(自备)

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℃ 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 1mL 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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 520nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定:

(1) 取 0.5mL 样本+0.5mL 试剂一+0.5mL 试剂二 于有盖试管中, 置 95℃ 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, 在试管中加入 1mL 试剂三, 振荡 30s, 静置片刻, 使色素转至试剂三中; 吸取 0.8mL-1mL 上层溶液于 1mL 玻璃比色皿中, 于 520nm 波长处比色, 记录吸光值 A。



北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com

Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

Pro 含量计算:

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($\mu\text{g/mL}$)= $[(A+0.0021) \div 0.0521 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 19.2 \times (A+0.0021)$

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($\mu\text{g}/10^4$ 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, 0.5mL; 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 $0.01\mu\text{g/mg prot}$

