

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。

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 25mL、甲苯 50mL、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 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 90℃ 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 90℃ 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 90℃ 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、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，置沸水浴中保温 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

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

3、按照蛋白浓度计算

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

4、按照样本质量计算

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

5、按照细菌或细胞密度计算

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

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

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

3、按照蛋白浓度计算

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

4、按照样本质量计算

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

3、按照细菌或细胞密度计算

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

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 $1\mu\text{g/mL}$ 。