

吡咯啉-5-羧酸还原酶 (Pyrroline-5-carboxylate Reductase, P5CR) 试剂盒说明书

可见分光光度法 50 管/24 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:

吡咯啉-5-羧酸还原酶(P5CRs) 是普遍存在于原核和真核生物中的一类重要的管家蛋白。其主要功能是催化脯氨酸生物合成的最后一步反应, 将吡咯啉-5-羧酸(P5C) 转化为脯氨酸, 在调节细胞凋亡等一系列病理和生理过程中起着重要作用。

测定原理:

P5CR 具有噻唑烷-4-羧酸脱氢酶活性, 催化噻唑烷-4-羧酸的脱氢反应, 同时将 NAD 转化为 NADH, 使 WST-8 变成橙黄色, 测定 450nm 下吸光值增加速率来反映酶的活性。

需自备的仪器和用品:

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

试剂组成和配制:

提取液: 液体 60mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂一: 液体 60mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存;

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存;

试剂四: 液体 3mL×1 瓶, 4°C 避光保存。

粗酶液提取:

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); 12000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

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。12000g 4°C 离心 10min, 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 450nm。

2、样本测定

(1) 临用前在试剂二中加入 30mL 试剂一, 试剂三中加入 15mL 试剂一, 充分溶解混匀, 用不完的试剂分装后-20°C 保存;

(2) 工作液的配制: 临用前按照样本数量, 按以下比例配制工作液, 配制后避光保存并在 30min 内使用

试剂名称 (μL)	测定工作液	对照工作液
试剂一		450
试剂二	450	450
试剂三	450	
试剂四	50	50

(3) 按下表在 96 孔板中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	50	50
测定工作液	950	
对照工作液		950

37°C避光孵育 30min, 450nm 下测定吸光值 A 测定与 A 对照, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

P5CR 活性计算:

标准条件下测定回归方程为 $y = 1.3384x - 0.0285$, $R^2 = 0.999$; x 为 NADH 含量 ($\mu\text{mol/mL}$), y 为吸光值。

1) 按样本蛋白浓度计算:

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

$$\begin{aligned} \text{P5CR (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0285) \div 1.3384 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times 1000 \div T \\ &= 24.9 \times (\Delta A + 0.0285) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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

$$\begin{aligned} \text{P5CR (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0285) \div 1.3384 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \div T \\ &= 24.9 \times (\Delta A + 0.0285) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

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

$$\begin{aligned} \text{P5CR (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0285) \div 1.3384 \times V_{\text{样}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \div T \\ &= 0.0498 \times (\Delta A + 0.0285) \end{aligned}$$

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 30 min;
 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; 1000, μmol 到 nmol 的换算系数。