

脯氨酸（PRO）含量测定试剂盒说明书

（货号：ADS-F-AJS004 分光法 48 样 有效期：9 个月）

一、指标介绍：

植物体内游离脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性，抗旱性强的品种往往积累较多的脯氨酸。因此测定脯氨酸含量可以作为抗旱育种的生理指标。另外，由于脯氨酸亲水性极强，能稳定原生质胶体及组织内的代谢过程，因而能降低凝固点，有防止细胞脱水的作用。在低温条件下，植物组织中脯氨酸含量增加，可提高植物的抗寒性，因此，亦可作为抗寒育种的生理指标。

当用磺基水杨酸提取植物样品时，脯氨酸便游离于磺基水杨酸的溶液中，然后与酸性茚三酮加热反应后形成红色物质，该红色物质在 520nm 处有最大吸收峰，进而通过比色法测定植物体内游离脯氨酸的含量。

二、试剂盒组分与配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	1. 使用前摇匀； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 若有沉淀，50℃水浴加热两分钟使其溶解，用前摇匀； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、冰醋酸（乙酸）、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，转移至 1.5mLEP 管后，于 90℃水浴振荡提取 10min；25℃×12000 rpm，离心 10min，取上清，冷却后待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

② 液体样本：取 0.1mL 液体样本加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，转移至 1.5mLEP 管后，于 90℃水浴振荡提取 10 分钟，12000rpm，25℃离心 10min，取上清，冷却后待测。

【注】：若增加样本量，可按照液体体积（mL）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例提取。

③ 细菌/培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞至 EP 管中，加 1mL 的提取液，于 90℃水浴振荡提取 10min；25℃×12000 rpm，离心 10min，取出上清液待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为500:1比例进行提取。

2、检测步骤

① 可见分光光度计预热 30min 以上(等待仪器过自检程序亦可), 调节波长至 520nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

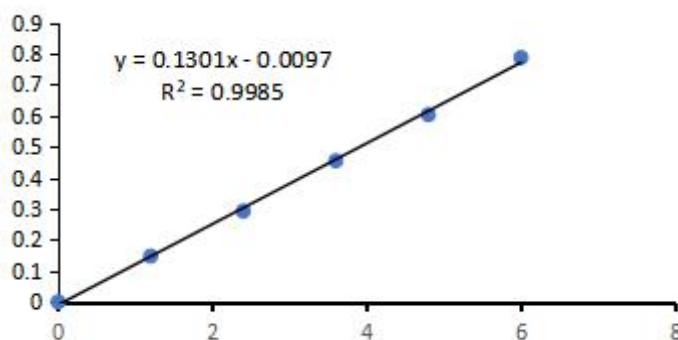
试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	300	
蒸馏水		300
冰醋酸	300	300
试剂一	600	600
置 95°C水浴中加热 30min (盖紧封口, 防止盖子爆开水分散失), 冷却至室温。吸取 800μL 澄清溶液于 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 520nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】: 1. 吸光度 ΔA 线性范围为 0.01-1.0, 若 ΔA 超过 1.0 可减少样本加样量 V_1 (如减至 150μL, 则冰醋酸相应增加) 则改变后的 V_1 需代入计算公式重新计算。

2. 若 ΔA 值低于 0.005, 可增加样本加样体积 V_1 (如增至 450μL, 则冰醋酸减至为 150μL), 或增加样本取样质量 W , 可改变后的 V_1 和 W 需带入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.1301x - 0.0097$; x 为标准品质量 (μg), y 为 ΔA 。



2、按样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸(Pro)含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0097) \div 0.1301] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 25.62 \times (\Delta A + 0.0097) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸(Pro)含量}(\mu\text{g/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0097) \div 0.1301] \div (C_{\text{pr}} \times V_1 \div V) \times D \\ &= 25.62 \times (\Delta A + 0.0097) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

4、按液体体积计算:

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸(Pro)含量}(\mu\text{g/mL}) &= [(\Delta A + 0.0097) \div 0.1301] \div [V_2 \times V_1 \div (V + V_2)] \times D \\ &= 281.83 \times (\Delta A + 0.0097) \times D \end{aligned}$$

5、按细菌/细胞密度计算:

$$\begin{aligned}\text{脯氨酸(Pro)含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0097) \div 0.1301] \div [V2 \times V1 \div (V + V2)] \times D \\ &= 281.83 \times (\Delta A + 0.0097) \div 500 \times D\end{aligned}$$

V---提取液的总体积, 1mL; V1---加入反应体系提取液的体积, 0.3mL;
V2---液体样品量, 0.1mL; W---样品质量, g;
500---细菌或细胞总数, 万; D---稀释倍数, 未稀释即为 1。
Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液（1mg/mL）：标准品溶解在 1mL 蒸馏水中，充分混匀。
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，4，8，12，16，20 $\mu\text{g/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 100uL，加入 4.9ml 蒸馏水，混匀得到 20 $\mu\text{g/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{g/mL}$	0	4	8	12	16	20
标品稀释液 uL	0	80	160	240	320	400
水 uL	400	320	240	160	80	0
各标准管混匀待用。						

5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	150	
蒸馏水		150
冰醋酸	150	150
试剂一	300	300
置 95°C 水浴中加热 30min（盖紧封口，防止盖子爆开水分散失），冷却至室温。吸取 200 μL 澄清液体于 96 孔板中，立即于 520nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		