

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

分光光度法 50 管/48 样

注 意：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，测定 340nm 下吸光值增加速率来反映酶的活性。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×2 瓶，-20℃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（10⁴ 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℃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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1、 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、 样本测定

（1）在试剂二中加入 25mL 试剂一充分溶解混匀，现配现用；

（2）在 96 孔板中加入 50 μL 样本和 950 μL 试剂二，混匀，立即记录 340nm 处 10s 时的吸光值 A1 和 2min10s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

P5CR 活性计算:

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。P5CR (nmol/min/mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T$
= $1608 \times \Delta A \div \text{Cpr}$

(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。P5CR (nmol/min/g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$
= $1608 \times \Delta A \div W$

(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。P5CR (nmol/min/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$
= $3.22 \times \Delta A$

V_{反总}: 反应体系总体积, 1×10⁻³ L; ε: NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V_样: 加入样本体积, 0.05 mL; V_{样总}: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 2 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。

