脯氨酸脱氢酶（Proline dehydrogenase，ProDH)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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：

ProDH 是存在于线粒体内的催化脯氨酸降解的关键酶。脯氨酸是分布最广泛的一种渗透物质，在胁迫条件下很多植物可以通过增加合成、减少降解而在体内累积大量脯氨酸，降低 ProDH 活性对于调节渗透平衡、防止渗透胁迫对植物造成伤害、清除自由基、保护细胞结构具有重要意义。

测定原理：

利用异硫氰酸甲酯检测 ProDH 催化的脱氢反应，600nm 处吸光值的吸光值的变化反映酶活性的高低。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 2 mL×1 支，　4℃保存；

试剂二：液体 25mL×1 瓶，　4℃保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，　4℃保存；临用前加入 4mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4℃保存；

试剂四：粉剂×1 瓶，　4℃保存；临用前加入 4mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4℃保存；

试剂五：粉剂×4 支，4℃保存；

粗酶液提取：

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 样本，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆，1500g 4℃离心 15min，取上清液于一支新的 EP 管中，加入一滴试剂一（用 10μL 的枪头加入），涡旋混匀，冰浴放置 30min 后，16000g 4℃离心 20min，取上清置冰上待测。

测定步骤：

1、　分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 600nm，蒸馏水调零。

2、　样本测定

（1）混合液的配制：首先将试剂三和试剂四配成溶液（见试剂的组成和配制），临用前根据用量按照试剂二（V）：试剂三（V）：试剂四（V）=2.4（mL）：0.3（mL）：0.3（mL）的比例充分混匀。（注意：现配现用，用多少配多少），置于 30℃水浴 5min；

（2）试剂五的配制：取试剂五一支，临用前加入 500μL 蒸馏水充分溶解待用，现配现用。

（3）在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 35μL 样本、15μL 试剂五和 150μL 混合液，混匀，立即记录 600nm 处初始吸光值 A1 和 10min 后的吸光值 A2，计算 ΔA=A2-A1。

ProDH 活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每分钟每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中使 600nm 处吸光值变化 0.01 为一个

酶活力单位。

ProDH（U/mg prot）=ΔA×V 反总÷（V 样×Cpr）÷0.01÷T =57.14×ΔA÷Cpr

（2）按样本鲜重计算：

单位定义：每分钟每 g 组织在每 mL 反应体系中使 600nm 处吸光值变化 0.01 为一个

酶活力单位。

ProDH（U/g 鲜重）=ΔA×V 反总÷(W× V 样÷V 样总)÷0.01÷T =57.14×ΔA÷W

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； V 样：加入样本体积，0.035mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，10 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每分钟每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中使 600nm 处吸光值变化 0.005 为一个

酶活力单位。

ProDH（U/mg prot）=ΔA×V 反总÷（V 样×Cpr）÷0.005÷T =114.29×ΔA÷Cpr

（2）按样本鲜重计算：

单位定义：每分钟每 g 组织在每 mL 反应体系中使 600nm 处吸光值变化 0.005 为一个

酶活力单位。

ProDH（U/g 鲜重）=ΔA×V 反总÷(W× V 样÷V 样总)÷0.005÷T =114.29×ΔA÷W

V 反总：反应体系总体积，0.2mL；V 样：加入样本体积，0.035mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，10 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。