

脯氨酸脱氢酶（PDH）试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

脯氨酸脱氢酶(proline dehydragenase, PDH, EC 1.5.1.2) 催化脯氨酸生成 Δ^1 -二氢吡咯-5-羧酸的反应, 是脯氨酸降解过程的限速步骤。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 PDH 活性对于防止渗透胁迫对植物造成伤害、保护细胞结构等方面具有重要意义。

脯氨酸脱氢酶(PDH)催化脯氨酸脱氢并使 NAD^+ 还原成 NADH, 通过检测 NADH 在 340nm 处的增加速率即可得出 PDH 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下, 使粉体落到底部, 再加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下, 使粉体落到底部, 再加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、脯氨酸脱氢酶（PDH）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备：

称取约 0.1g 组织样本, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【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、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	10
试剂二	140
试剂三	10
轻轻混匀, 室温 (25℃) 下, 可先孵育 6min 后于 340nm 处读取 A1, 30min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】 1. 若 ΔA 的值在零附近, 可以适当延长反应时间 T 到 60min 后或更长读取 A2, 改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当增加样本取样质量 W, 则改变后的反应时间 T 和样本质量 W 需代入计算公式重新计算。

2. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对

会偏高), 可以适当减少样本加样量 V1 (如减至 20 μ L, 则试剂三相应增加), 则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 上清液用于检测;

3. 若上升趋势不稳定, 可以每隔 2min 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段 T 参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算

单位定义: 每毫克组织蛋白在每分钟内生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PDH (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 53.6 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2、按样本鲜重计算

单位定义: 每克组织在每分钟内生成 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PDH (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 53.6 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.04mL;

V2---反应体系总体积, 2 $\times 10^{-4}$ L;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L / mol /cm;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 30min;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。