

吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHA8-C24	吡咯啉-5-羧酸合成酶活性检测试剂盒	24T	常量法
AYHA8-C48		48T	

一、测定意义：

吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS）是脯氨酸和多胺合成途径中的关键酶，参与氨基酸代谢、渗透调节和应激反应。哺乳动物肝脏中 P5CS 活性高低与血液脯氨酸浓度直接相关，可用于分析氨基酸代谢平衡。

二、测定原理：

吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS）是一个双功能酶，在 NADPH 和 ATP 作用下，可催化谷氨酸磷酸化及谷氨酸 γ -半醛还原，NADPH 在 340 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征 P5CS 的活性。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(24T)	试剂装量(48T)	保存条件
提取液 A	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2~8℃保存
提取液 B	液体 0.5mL×1 瓶	液体 1mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂一	液体 20mL×1 瓶	液体 40mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂二	液体 3mL×1 瓶	液体 6mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂三	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
试剂三配制： 使用前每瓶粉剂中加入 3mL 蒸馏水充分溶解。			
试剂四	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
试剂四配制： 使用前每瓶粉剂中加入 3 mL 蒸馏水充分溶解。			

四、操作步骤：

样本前处理

1、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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液 A）进行冰浴匀浆，再加入 10 μ L 提取液 B 充分混匀后 4℃ 10000 g 离心 10 min，取上清即为粗酶液，置于冰上待测。

2、细菌、细胞：按照细胞数量 10⁴ 个：提取液体积（mL）500~1000:1

的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液 A），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3 min），再加入 10 μ L 提取液 B 充分混匀后 4℃ 10000 g 离心 10 min，取上清即为粗酶液，置于冰上待测。

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（在 1mL 石英比色皿中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定管	空白管
样品（ μ L）	100	-
蒸馏水（ μ L）	-	100
试剂一（ μ L）	600	600
试剂二（ μ L）	100	100
试剂三（ μ L）	100	100
试剂四（ μ L）	100	100

充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1_{测定} 和 A1_{空白}；37℃ 准确反应 300 s（即 5min），测定 310 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2_{测定} 和 A2_{空白}；计算 $\Delta A_{测定} = A1_{测定} - A2_{测定}$ ， $\Delta A_{空白} = A1_{空白} - A2_{空白}$ ， $\Delta A = \Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}$ 。注：空白组只需测定 1-2 次。

五、吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS）活性测定：

1、按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{计算公式：P5CS (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{反总} \times 10^9 \div (\epsilon \times d \times V_{样} \times C_{pr} \times T) \\ = 321.54 \times \Delta A \div C_{pr}$$

2、按样本质量计算

单位定义：每 g 组织样品每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{计算公式：P5CS (U/g)} = \Delta A \times V_{反总} \times V_{样总} \times 10^9 \div (\epsilon \times d \times V_{样} \times W \times T)$$

$$=324.76 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细胞每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

计算公式：
$$P5CS(U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times N \times T)$$

$$=324.76 \times \Delta A \div N$$

$V_{\text{样总}}$ ：待测样本总体积，1.01 mL； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， 1×10^{-3} L；

$V_{\text{样}}$ ：反应体系中加入粗酶液的体积，0.1 mL； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d ：1 mL 石英比色皿光径，1 cm； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL； W ：样本质量，g； T ：反应时间：300 s = 5 min； 10^9 ：单位换算系数，1 mol = 10^9 nmol； N ：细菌或细胞数量，以万计。

六、 注意事项：

- 1、若 $A_{1\text{cm}}$ 测定大于 1.2 或 ΔA 大于 0.5，建议将样品稀释后再进行测定，若 ΔA 小于 0.02，可适当 延长反应时间后再进行测定，计算时相应修改；
- 2、空白组为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况变化不超过 0.05；
- 3、准确在 10 s 和 310 s 处完成吸光值测定，以确保试验结果的准确性和重复性；
- 4、若样本较多，可将试剂二，试剂三，试剂四按照 1：1：1 比例配制成工作液；
- 5、为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

【厂家信息】

生产企业：南京陌凡生物科技有限公司

地址：南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

【售后微信】



【说明书核准及修改日期】

核准日期：2025 年 4 月 7 日

修改日期：2025 年 4 月 7 日