

## 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-M48	吡咯啉-5-羧酸合成酶活性检测试剂盒	48T	微量法
AYHA8-M96		96T	

### 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 $\gamma$ -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(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液 A	液体 60mL×1 瓶	液体 110mL×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 8mL×1 瓶	液体 15mL×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
<b>试剂三配制：</b> 使用前每瓶粉剂中加入 1.5mL 蒸馏水充分溶解。			
试剂四	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
<b>试剂四配制：</b> 使用前每瓶粉剂中加入 1.5 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  $\mu$ 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  $10^4$  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  $\mu$ 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、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、样本测定（在 96 孔 UV 板中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定管	空白管
样品 ( $\mu$ L)	20	-
蒸馏水 ( $\mu$ L)	-	20
试剂一 ( $\mu$ L)	120	120
试剂二 ( $\mu$ L)	20	20
试剂三 ( $\mu$ L)	20	20
试剂四 ( $\mu$ L)	20	20

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  $A_{1\text{ 测定}}$  和  $A_{1\text{ 空白}}$ ；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  $A_{2\text{ 测定}}$  和  $A_{2\text{ 空白}}$ ；计算  $\Delta A_{\text{ 测定}} = A_{1\text{ 测定}} - A_{2\text{ 测定}}$ ， $\Delta A_{\text{ 空白}} = A_{1\text{ 空白}} - A_{2\text{ 空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{ 测定}} - \Delta A_{\text{ 空白}}$ 。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。

$$\begin{aligned} \text{计算公式: } P5CS (\text{U/mg prot}) &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}} \times T) \\ &= 535.9 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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。

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

$$= 541.27 \times \Delta A \div W$$

### 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。

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

$$= 541.27 \times \Delta A \div N$$

$V_{\text{样总}}$ : 待测样本总体积, 1.01 mL;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  
 $V_{\text{样}}$ : 反应体系中加入粗酶液的体积, 0.02 mL;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L/mol/cm;  $d$ : 96 孔 UV 板光径, 0.6 cm; Cpr: 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  $A_1$  测定大于 1.2 或  $\Delta A$  大于 0.5, 建议将样品稀释后再进行测定, 若  $\Delta A$  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