

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
PYHF4-M48	吡咯啉-5-羧酸合成酶活性检测试剂盒	48T	微量法
PYHF4-M96		96T	

一、测定意义：

吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS）是植物脯氨酸生物合成途径中的关键限速酶，其活性测定在植物生理和逆境生物学研究中具有重要意义。作为脯氨酸合成的限速酶，P5CS 活性直接关联植物渗透调节与胁迫响应机制。检测 P5CS 活性可反映植物对干旱、盐碱、极端温度等逆境的适应能力，助力抗逆品种筛选。P5CS 活性升高提示植物处于胁迫早期或氧化应激状态，可作为胁迫预警指标。为作物抗逆栽培、激素调控及水分管理提供关键生化依据。

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(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°C 保存
提取液 B	液体 0.5mL×1 瓶	液体 1mL×1 瓶	2~8°C 保存
试剂一	液体 8mL×1 瓶	液体 15mL×1 瓶	2~8°C 保存
试剂二	液体 3mL×1 瓶	液体 6mL×1 瓶	2~8°C 保存
试剂三	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20°C 保存
试剂三配制： 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°C 保存
试剂四配制： 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

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，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 A）处理样品，室温研磨至匀浆，再加入 10 μ L 提取液 B 充分混匀，冰浴 30min 后 4°C 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（ μ L）	20	-
蒸馏水（ μ L）	-	20
试剂一（ μ L）	120	120
试剂二（ μ L）	20	20
试剂三（ μ L）	20	20
试剂四（ μ 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°C 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。

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

- 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。

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

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

$V_{\text{样总}}$: 待测样本总体积, 1.01 mL; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L;

$V_{\text{样}}$: 反应体系中加入粗酶液的体积, 0.02 mL; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 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。

六、 注意事项:

1、若 A_{10} 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