

脯氨酸（Pro）含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

规格：50T/48S

产品组成：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：冰乙酸 4℃ 保存。（自备）

试剂二：液体 45 mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：甲苯 4℃ 保存。（自备）

标准品：脯氨酸 10mg，4℃ 保存。

产品说明：

脯氨酸(Pro)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，逆境条件下，植物体内 Pro 含量显著增加。Pro 增加量在一定程度上反映了抗逆性，抗旱性强的品种往往积累较多的脯氨酸。因此，脯氨酸增加量可以作为抗逆育种的生理指标之一。

用磺基水杨酸（SA）提取 Pro，加热处理后，Pro 与酸性茚三酮溶液反应生成红色；加甲苯萃取后，在 520nm 测定吸光度。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、冰乙酸、甲苯、研钵、冰和蒸馏水。

样品测定的准备：

1、细胞、细菌或组织样品的制备：

细菌或细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，弃上清；按照每 100 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次），之后置沸水浴振荡提取 10min；10000g，常温离心 10min，取上清，冷却后待测。

组织：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆；之后置沸水浴振荡提取 10min，10000g，常温离心 10min，取上清，冷却后待测。

2、血清（浆）样品：取 100 μ L 血清（浆）加入 0.9mL 提取液，充分混匀，之后置沸水浴振荡提取 10 分钟，10000g，常温离心 10 分钟，取上清，冷却后待测。

3、标准品的处理：称取 1mg，将标准品稀释为 15、10、8、6、4、2、1、0 μ g/ml。

测定步骤：

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 520nm，甲苯调零。

2、取 0.5mL 上清液（或稀释后的标准品）+0.5mL 试剂一+0.5mL 试剂二于有盖试管中，置沸水浴

中保温 30min（盖紧，防止水分散失），每 10min 振荡一次。

3、待冷却后，在试管中加入 1mL 试剂三，振荡 30s，静置片刻，使色素转至试剂三中；吸取 0.8mL-1mL 上层溶液于 1mL 玻璃比色皿中，于 520nm 波长处比色，记录吸光值。

4、根据标准品吸光值和浓度，建立标准曲线。

Pro 含量计算：

1、通过标准曲线计算样品脯氨酸含量(y 为脯氨酸含量， $\mu\text{g/mL}$ ；x 为 OD 值)

2、按照细菌、细胞个数或者组织鲜重计算，首先根据标准曲线求得 y 值：

细胞或细菌中脯氨酸含量($\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}$)= $y \div$ 细胞浓度(10^4 cell/mL)

Pro 含量($\mu\text{g/g mass}$) = $y \div$ 样本鲜重(g/mL)

3、血清（浆）中脯氨酸含量，首先根据标准曲线求得 y 值：

Pro 含量[$\mu\text{g/mL}$ 血清（浆）] = $y \div 0.1\text{mL}$ 血清（浆）/mL

注意：提取液中含有蛋白沉淀剂，提取的上清液不能用于蛋白浓度的测定。