

脯氨酸（Pro）含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC0295

规格：100T/96S、200T/192S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	100T 规格	200T 规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	液体 110 mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂一	自备试剂	自备试剂	-
试剂二	液体 35 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2-8℃保存

100T 溶液的配制：

1. 试剂一：自备冰乙酸，大约需要 35mL，常温保存；试剂盒内提供一个 30mL 棕色空瓶，仅做分装使用，请自行标注试剂名称。

2. 标准品：脯氨酸 10 mg，临用前加入 1 mL 蒸馏水，配成 10 mg/mL 标准品，2-8℃可保存 4 周。

200T 溶液的配制：

1. 试剂一：自备冰乙酸，大约需要 60mL，常温保存；试剂盒内提供一个 30mL 棕色空瓶，仅做分装使用，请自行标注试剂名称。

2. 标准品：脯氨酸 10 mg，临用前加入 1 mL 蒸馏水，配成 10 mg/mL 标准品，2-8℃可保存 4 周。

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，在 520nm 测定吸光度。

技术指标：

最低检出限：0.2876 μg/mL

线性范围：0.5-40 μg/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、冰乙酸（>98%，AR）、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）





1. 细胞、细菌：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000:1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），之后置沸水浴振荡提取 10min（缠封口膜，防止爆盖）；10000g，常温离心 10min，取上清，冷却后待测。
2. 组织样本：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），进行冰浴匀浆。之后置沸水浴振荡提取 10min（缠封口膜，防止爆盖），10000g，常温离心 10min，取上清，冷却后待测。
3. 血清（浆）样本：取 0.1mL 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（缠封口膜，防止爆盖），10000g，常温离心 10 分钟，取上清，冷却后待测。

注：可使用旋盖 EP 管或者带锁扣 EP 管防止爆盖。

二、测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 520nm，分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、标准品的处理：将 10 mg/mL（10000 μ g/mL）标准品用蒸馏水稀释为 40、20、10、8、4、2、1、0.5 μ g/mL。
- 3、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度（ μ g/mL）	标准品体积（ μ L）	蒸馏水体积（ μ L）	稀释后浓度（ μ g/mL）
1	10000	40	960	400
2	400	100	900	40
3	40	500	500	20
4	40	200	600	10
5	40	200	800	8
6	8	500	500	4
7	4	500	500	2
8	2	500	500	1
9	1	500	500	0.5

备注：下述实验中每个标准管需250 μ L标准品（注意不要在此步骤直接检测标准品吸光度）。

4、操作表：

试剂名称（ μ L）	测定管	标准管	空白管
上清液	250	--	-
标准品	-	250	-
蒸馏水	-	-	250
试剂一	250	250	250
试剂二	250	250	250

混匀后盖紧盖子（缠封口膜，防止爆盖），置于沸水浴中保温 30min，每 10min 振荡一次，冷却后吸取 0.2mL 于比色皿或者 96 孔板中在 520nm 波长处比色，记录吸光值 A 测定管、A 标准管、A 空白管，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。空白管和标准曲线只需做 1-2 次。

注：可使用旋盖 EP 管或者带锁扣 EP 管防止爆盖。

三、Pro 含量计算



- 1、以标准品浓度为横坐标， ΔA 标准为纵坐标绘制标准曲线，得到线性回归方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 代入方程得到 x ($\mu\text{g/mL}$)。
- 2、按照细菌、细胞数量计算
 $\text{Pro 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = x \times V_{\text{提}} \div N \times F = x \div N \times F$
- 3、按照组织质量计算
 $\text{Pro 含量}(\mu\text{g/g 质量}) = x \times V_{\text{提}} \div W \times F = x \div W \times F$
- 4、按照血清（浆）体积计算
 $\text{Pro 含量}(\mu\text{g/mL}) = 10 \times x \times F$
 $V_{\text{提}}$: 加入提取液体积，1mL; W : 样本质量，g; N : 细菌或细胞数量，以 10^4 为单位，万个; 10: 血清稀释倍数， $(0.1+0.9) \div 0.1=10$; F : 稀释倍数。

注意事项:

1. 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。
2. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定

相关发表文献:

- [1] Wang L, Wang S, Tong R, Wang S, Yao J, Jiao J, Wan R, Wang M, Shi J, Zheng X. Overexpression of PgCBF3 and PgCBF7 Transcription Factors from Pomegranate Enhances Freezing Tolerance in Arabidopsis under the Promoter Activity Positively Regulated by PgICE1. *Int J Mol Sci.* 2022 Aug 21;23(16):9439. doi: 10.3390/ijms23169439. PMID: 36012703; PMCID: PMC9408969.
- [2] Yuan Z, Wang J, Qu Q, Zhu Z, Xu M, Zhao M, Sun C, Peng H, Huang X, Dong Y, Dong C, Zheng Y, Yuan S, Li Y. Celastrol Combats Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus by Targeting $\Delta 1$ -Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase. *Adv Sci (Weinh).* 2023 Sep;10(25):e2302459. doi: 10.1002/advs.202302459. Epub 2023 Jun 28. PMID: 37381655; PMCID: PMC10477891.
- [3] Du L, Huang X, Ding L, Wang Z, Tang D, Chen B, Ao L, Liu Y, Kang Z, Mao H. TaERF87 and TaAKS1 synergistically regulate TaP5CS1/TaP5CR1-mediated proline biosynthesis to enhance drought tolerance in wheat. *New Phytol.* 2023 Jan;237(1):232-250. doi: 10.1111/nph.18549. Epub 2022 Nov 15. PMID: 36264565.
- [4] Chen P, Liu P, Zhang Q, Bu C, Lu C, Srivastava S, Zhang D, Song Y. Gene Coexpression Network Analysis Indicates that Hub Genes Related to Photosynthesis and Starch Synthesis Modulate Salt Stress Tolerance in Ulmus pumila. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 23;22(9):4410. doi: 10.3390/ijms22094410. PMID: 33922506; PMCID: PMC8122946.
- [5] Wu L, Chang Y, Wang L, Wang S, Wu J. The aquaporin gene PvXIP1;2 conferring drought resistance identified by GWAS at seedling stage in common bean. *Theor Appl Genet.* 2022 Feb;135(2):485-500. doi: 10.1007/s00122-021-03978-w. Epub 2021 Oct 26. PMID: 34698878.

参考文献:

- [1] Vieira S M, Silva T M, Glória M B A. Influence of processing on the levels of amines and proline and on the physico-chemical characteristics of concentrated orange juice[J]. *Food chemistry*, 2010, 119(1): 7-11.
- [2] Demiral T, Türkan I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance[J]. *Environmental and experimental botany*, 2005, 53(3): 247-257.





相关系列产品:

BC1550/BC1555 谷丙转氨酶 (GPT/ALT) 活性检测试剂盒

BC1560/BC1565 谷草转氨酶 (GOT/AST) 活性检测试剂盒

BC0180/BC0185 半胱氨酸 (Cys) 含量检测试剂盒

BC1580/BC1585 谷氨酸 (Glu) 含量检测试剂盒

