



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

脯氨酸(PRO)检测试剂盒(茚三酮比色法)

简介:

脯氨酸(Proline, Pro)是一种环状的 α -亚氨基酸, 呈中性, 等电点为 6.30, 水中溶解度比任何氨基酸都大, 25℃时 100g 水中可溶 162g 左右, 易潮解不易得结晶, 有甜味。脯氨酸与茚三酮溶液共热, 生成黄色化合物, 一旦进入肽链后, 可发生羟基化作用, 从而形 4-羟脯氨酸, 是组成动物胶原蛋白的重要成分, 羟脯氨酸也存在于多种植物蛋白质中, 尤其与细胞壁的形成有关, 在正常情况下脯氨酸含量较低, 但在逆境下(旱、热、冷、冻、盐碱等), 常有脯氨酸的明显积累, 即积累指数与植物的抗逆性有关, 在临床、生物材料、工业等方面均有广泛应用。

源叶生物 脯氨酸(PRO)检测试剂盒(茚三酮比色法)检测原理是脯氨酸游离于磺基水杨酸溶液中, 前者与酸性茚三酮共热发生反应, 产生稳定的红色产物, 以分光光度计测定 520nm 处吸光度值, 在一定浓度范围内颜色深浅与脯氨酸浓度成正比。该试剂盒主要用于测定植物组织中的游离脯氨酸含量, 仅用于科研领域, 不宜用于临床诊断或其他用途。

组成:

名称 \ 编号	R30341 50T	Storage
试剂(A): 脯氨酸标准(100 μ g/ml)	1ml	4℃ 避光
试剂(B): PRO Lysis buffer(5 \times)	50ml	RT
试剂(C): PRO Assay buffer	50ml	RT
试剂(D): 茚三酮	1.3g	RT 避光
试剂(E): 茚三酮稀释液	50ml	RT
使用说明书	1 份	



自备材料:

- 1、蒸馏水或去离子水、甲苯或二甲苯
- 2、电子天平、研钵或匀浆器、滤纸或纱布
- 3、离心机、带螺旋盖的离心管或试管、水浴锅或电热炉
- 4、分光光度计、比色杯(不宜用塑料的)

操作步骤(仅供参考):

1、配制 PRO Lysis buffer(1×): 取 1 份 PRO Lysis buffer(5×)加 4 份去离子水混匀即成。

2、配制茚三酮显色液: 准确称取 1.25 g 茚三酮, 溶解于 50ml 茚三酮稀释液中, 70℃加热搅拌至完全溶解(也可用超声助溶), 混匀, 即为茚三酮显色液。4℃避光备用, 48h 有效。注意: 茚三酮稀释液具有一定腐蚀性, 请小心操作。如果 2 天内用不完, 可以称取一定量的茚三酮, 加入茚三酮稀释液使终浓度为 2.5%即可。

3、准备样品:

①植物样品: 取新鲜植物组织, 清洗干净, 擦干, 切碎, 迅速称取 0.5g, 加入 5ml PRO Lysis buffer(1×)后匀浆或研磨, 沸水浴 10min(期间经常摇动), 混匀, 用滤纸或纱布过滤, 滤液即为脯氨酸提取液, 4℃保存备用。

②血浆、血清和尿液样品: 血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于本试剂盒的测定, -20℃冻存, 用于脯氨酸的检测。

③细胞或组织样品: 取恰当细胞或组织裂解液, 如有必要用 PRO Lysis buffer(1×)进行适当匀浆, 留取上清即脯氨酸提取液, 用于脯氨酸的检测。4℃保存备用, 3 天有效。

④高活性样品: 如果样品中含有较高浓度的脯氨酸, 可以使用 PRO Lysis buffer(1×)进行恰当的稀释。

配制系列脯氨酸标准溶液: 取出脯氨酸标准(100μg/ml)恢复至室温后, 用去离子水稀释为脯氨酸标准(10μg/ml), 再按下表进行梯度稀释:



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

加入物(ml)	1	2	3	4	5	6	7
脯氨酸标准(10 μ g/ml)	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
蒸馏水	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2
脯氨酸浓度(μ g/ml)	2	3	4	5	6	7	8

5、PRO 加样: 按照下表设置空白管、标准管、测定管, 溶液应按照顺序依次加入, 并注意避免产生气泡。如果样品中的脯氨酸浓度过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定, 样品的检测最好能设置平行管。

加入物(ml)	空白管	标准管	测定管
蒸馏水	1	—	—
系列脯氨酸标准(1~7 号)	—	1	—
脯氨酸提取液	—	—	1
PRO Assay buffer	1	1	1
茚三酮显色液	1	1	1
混匀, 沸水浴 30min, 溶液呈红色。			

6、PRO 测定: 迅速冷却加入 2~3ml 甲苯或二甲苯, 振摇 30s, 静置片刻, 取上清液转移至新的离心管或试管, 3000r/min 离心 10min, 上清液加入比色杯中, 空白管调零, 520nm 处用分光光度计(1cm 光径)测定标准管和测定管的吸光度。注: 加入甲苯或二甲苯的量前后应统一; 空白管和标准管不用离心, 可直接取上清液测定。

计算:

以系列脯氨酸标准(1~7 号)浓度(μ g/ml)为横坐标, 以对应的吸光度为纵坐标, 制作标准曲线, 根据测定管的吸光度进而计算其脯氨酸浓度。根据如下公式计算具体样品中脯氨酸的含量:

$$\text{植物组织样品 PRO}(\mu\text{g/g}) = C \times V_T / W$$

式中: C=从标准曲线上查得的脯氨酸浓度(μ g/ml)

V_T =脯氨酸提取液总体积(ml)

W=样品鲜重(g)



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

血清、尿液等样品 $\text{PRO} (\mu\text{g/ml}) = C \times N$

式中: C = 从标准曲线上查得的脯氨酸浓度($\mu\text{g/ml}$)

N = 稀释倍数

注意事项:

- 1、实验材料应尽量新鲜, 如取材后不立即使用, 应存于 4°C 。
- 2、PRO Assay buffer 应密闭保存, 防止挥发。
- 3、PRO Lysis buffer($5\times$)、PRO Assay buffer 和茚三酮稀释液都有一定腐蚀性, 应小心操作。
- 4、茚三酮显色液配制后可 4°C 避光保存 48h 有效。建议尽快使用或用多少配多少。
- 5、本检测方法, 资料中大多建议使用甲苯进行抽提反应后的红色色素, 因甲苯管制或不易获得, 经我公司对比实验及检测结果发现, 二甲苯可有效替代甲苯进行抽提。
- 6、因甲苯或二甲苯都有一定危害性, 使用时应在通风橱中小心抽取, 用后应及时盖紧瓶盖, 防止挥发。
- 7、如果没有分光光度计, 也可以使用普通的酶标仪测定, 但应考虑酶标仪的最大检测体积。
- 8、测定时不能使用塑料的酶标条或比色皿, 因甲苯或二甲苯等有机溶剂与其反应, 使测定结果不准确。
- 9、所测样本的 PRO 浓度过高, 应用 PRO Lysis buffer($1\times$)稀释样品后重新测定。
- 10、沸水浴的反应过程中, 应使用密封性能好的带螺旋盖子的离心管, 防止因密封性不好而导致水分进入; 不宜使用扣盖离心管, 避免因爆沸使得盖子崩开而导致水分进入; 此二种原因都可能导致测定结果不准。
- 11、沸水浴的反应过程中, 人员不应随意接近, 防止液体喷出, 导致伤人事故的发生。
- 12、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

有效期: 6个月有效。4℃运输, 4℃保存。

附录: 标准曲线制作: 在室温条件下按说明书操作, 系列脯氨酸标准(0、1、2~10μg/ml)、PRO Assay buffer 和茚三酮显色液各 1ml, 沸水浴 30min 后冷却, 加入 2ml 甲苯, 振摇 30s, 静置 1min, 抽取上层, 空白管调零, 用分光光度计 520nm 对各管进行吸光度的测定。测定结果及标准曲线如下图所示, 仅供参考:

