

吡咯啉-5-羧酸还原酶（Pyrroline-5-carboxylate Reductase, P5CR）试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

吡咯啉-5-羧酸还原酶 (P5CRs) 是普遍存在于原核和真核生物中的一类重要的管家蛋白。其主要功能是催化脯氨酸生物合成的最后一步反应，将吡咯啉-5-羧酸 (P5C) 转化为脯氨酸，在调节细胞凋亡等一系列病理和生理过程中起着重要作用。

测定原理：

P5CR 具有噻唑烷-4-羧酸脱氢酶活性，催化噻唑烷-4-羧酸的脱氢反应，同时将 NAD 转化为 NADH，使 WST-8 变成橙黄色，测定 450nm 下吸光值增加速率来反映酶的活性。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂四：液体 1.5mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

粗酶液提取：

细菌或培养细胞：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（10⁴ 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 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。12000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

2、样本测定

（1）临用前在试剂二中加入 12mL 试剂一，试剂三中加入 6mL 试剂一，充分溶解混匀，用不完的试剂分装后-20℃ 保存；

（2）工作液的配制：临用前按照样本数量，按以下比例配制工作液

试剂名称 (μL)	测定工作液	对照工作液
试剂一		90
试剂二	90	90
试剂三	90	
试剂四	10	10

(3) 按下表在 96 孔板中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	10	10
试剂二	190	

37°C 避光孵育 30min, 450nm 下测定吸光值 A 测定与 A 对照, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

P5CR 活性计算:

标准条件下测定回归方程为 $y = 0.6692x - 0.0285$, $R^2 = 0.999$; x 为 NADH 含量 (μmol/mL), y 为吸光值。

1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每Δ分钟产生 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{P5CR (nmol/min/mg prot)} &= (A + 0.0285) \div 0.6692 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times 1000 \div T \\ &= 49.8 \times (A + 0.0285) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟Δ产生 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{P5CR (nmol/min/g 鲜重)} &= (A + 0.0285) \div 0.6692 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \div T = 49.8 \times \\ &(A + 0.0285) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或Δ细胞每分钟产生 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{P5CR (nmol/min/10^4 cell)} &= (A + 0.0285) \div 0.6692 \times V_{\text{样}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \div T \\ &= 0.0996 \times (A + 0.0285) \end{aligned}$$

V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 30 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万; 1000, μmol 到 nmol 的换算系数。