

版本：精简版

修改日期：2024.03.09

脯氨酸(PRO)检测试剂盒(茚三酮比色法)

产品简介：

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°C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，从而形成 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。

Leagene 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。

产品组成：

| 名称 | 编号 | TC2163 50T | Storage |
|--------------------------------------|----|---------------|---------|
| 试剂(A): 脯氨酸标准(100 μ g/ml) | | 1ml | 4°C 避光 |
| 试剂(B): PRO Lysis buffer(5 \times) | | 50ml | RT 避光 |
| 试剂(C): PRO Assay buffer | | 50ml | RT |
| 试剂(D): 茚三酮 | | 1.3g | 4°C 避光 |
| 试剂(E): 茚三酮稀释液 | | 50ml | RT |
| 使用说明书 | | | 1 份 |

自备材料：

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

操作步骤(仅供参考)：

- 配制 PRO Lysis buffer(1 \times)：取 1 份 PRO Lysis buffer(5 \times)加 4 份去离子水混匀即成。
- 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°C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。

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，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。

4、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：

| | | | | | | | |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 加入物(ml) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 脯氨酸标准(10μg/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(μg/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，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，静置片刻，取上清液转移至新的离心管或试管，离心，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(μg/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：

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($\mu\text{g/ml}$)

V_T =脯氨酸提取液总体积(ml)

W=样品鲜重(g)

血清、尿液等样品 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。
- 13、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期：6 个月有效。低温运输，按要求保存。