

脯氨酸（PRO）含量测定试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

植物体内游离脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性，抗旱性强的品种往往积累较多的脯氨酸。因此测定脯氨酸含量可以作为抗旱育种的生理指标。另外，由于脯氨酸亲水性极强，能稳定原生质胶体及组织内的代谢过程，因而能降低凝固点，有防止细胞脱水的作用。在低温条件下，植物组织中脯氨酸含量增加，可提高植物的抗寒性，因此，亦可作为抗寒育种的生理指标。

当用磺基水杨酸提取植物样品时，脯氨酸便游离于磺基水杨酸的溶液中，然后与酸性茚三酮加热反应后形成红色物质，该红色物质在 520nm 处有最大吸收峰，进而通过比色法测定植物体内游离脯氨酸的含量。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	使用前摇匀。
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	若有沉淀，50℃水浴加热两分钟使其溶解，用前摇匀。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、冰醋酸（乙酸）、研钵、冰。

四、脯氨酸（PRO）含量的测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，转移至 1.5mLEP 管后，于 90℃水浴振荡提取 10min；25℃×12000 rpm，离心 10min，取上清，冷却后待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

② 液体样本：取 0.1mL 液体样本加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，转移至 1.5mLEP 管后，于 90℃水浴振荡提取 10 分钟，12000rpm，25℃离心 10min，取上清，冷却后待测。

【注】：若增加样本量，可按照液体体积（mL）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 520nm。

② 在 EP 管中依次加入：

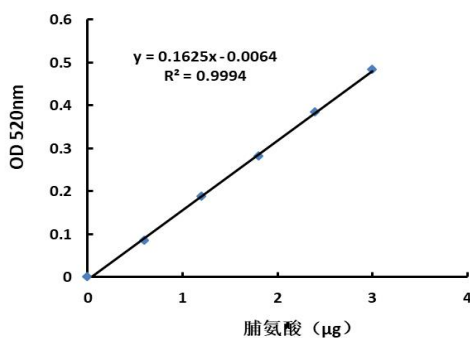
试剂名称（ μL ）	测定管	空白管（仅做一次）
样本	150	
蒸馏水		150
冰醋酸	150	150
试剂一	300	300
置 95℃水浴中加热 30min（盖紧封口，防止盖子爆开水分散失），冷却至室温。吸取 200 μL 澄清液体于 96 孔板中，立即于 520nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】: 1. 吸光度 ΔA 线性范围为 0.01-1.0, 若 ΔA 超过 1.0 可减少样本加样量 V_1 (如减至 100 μL , 则冰醋酸相应增加), 则改变后的 V_1 需代入计算公式重新计算。

2. 若 ΔA 值低于 0.005, 可增加样本加样体积 V_1 (如增至 300 μL , 则冰醋酸减至为 0 μL), 或增加样本取样质量 W , 可改变后的 V_1 和 W 需带入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.1625x - 0.0064$; x 为标准品质量 (μg); y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸 (Pro) 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0064) \div 0.1625] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 41.03 \times (\Delta A + 0.0064) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按照液体体积计算:

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸 (Pro) 含量}(\mu\text{g/mL}) &= [(\Delta A + 0.0064) \div 0.1625] \div [V_2 \times V_1 \div (V + V_2)] \times D \\ &= 451.3 \times (\Delta A + 0.0064) \times D \end{aligned}$$

V ---提取液的总体积, 1mL;

V_1 ---加入反应体系提取液的体积, 0.15mL;

V_2 ---液体样品量, 0.1mL;

W ---样品质量, g。

D ---稀释倍数, 未稀释即为 1。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL): 标准品溶解在 1mL 蒸馏水中, 充分混匀。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 4, 8, 12, 16, 20 $\mu\text{g/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。