

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

分光光度法 50 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，测定 340nm 下吸光值增加速率来反映酶的活性。

### 需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×2 瓶，-20℃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（10<sup>4</sup> 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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

（1）在试剂二中加入 25mL 试剂一充分溶解混匀，现配现用；

（2）在 96 孔板中加入 50 μL 样本和 950 μL 试剂二，混匀，立即记录 340nm 处 10s 时的吸光值 A1 和 2min10s 时的吸光值 A2，计算  $A=A_2-A_1$ 。

#### P5CR 活性计算：

1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。P5CR (nmol/min/mg prot) =  $[A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$

$$=1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。P5CR (nmol/min/g 鲜重) =  $[A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$$=1608 \times \Delta A \div W$$

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。P5CR (nmol/min/10<sup>4</sup> cell) =  $[A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

=  $3.22 \times \Delta A$

V<sub>反总</sub>：反应体系总体积，1×10<sup>-3</sup> L； ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10<sup>3</sup> L / mol /cm； d：比色皿光径，1cm； V<sub>样</sub>：加入样本体积，0.05 mL； V<sub>样总</sub>：加入提取液体积，1 mL； T：反应时间，2 min； C<sub>pr</sub>：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。



