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(茚三酮微板法)

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(茚三酮微板法)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，以酶标仪测定 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：

编号 / 名称	R30340 100T	Storage
试剂(A): 脯氨酸标准(100μg/ml)	1ml	4℃ 避光
试剂(B): PRO Lysis buffer(5×)	100ml	RT
试剂(C): PRO Assay buffer	30ml	RT
试剂(D): 茚三酮	0.8g	RT 避光
试剂(E): 茚三酮稀释液	30ml	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、酶标仪、96 孔板或酶标板(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 Lysisbuffer(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 0.75g 茚三酮，溶解于 30ml 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。

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	0.3	—	—
系列脯氨酸标准(1~7 号)	—	0.3	—
脯氨酸提取液	—	—	0.3
PRO Assay buffer	0.3	0.3	0.3
茚三酮显色液	0.3	0.3	0.3
混匀，沸水浴 30min，溶液呈红色。			

6、PRO 测定：迅速冷却加入 0.6~0.9ml 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，取上清液 200μl 分别加至 96 孔板中，空白管调零，520nm 处用酶标仪测定标准管和测定管吸光度。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(μg/g)=C×V_T/W

式中：C=从标准曲线上查得的脯氨酸浓度(μg/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 (μg/ml)=C×N

式中：C=从标准曲线上查得的脯氨酸浓度(μg/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℃。

2、PRO Assay buffer 应密闭保存，防止挥发。

3、PRO Lysis buffer(5×)、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℃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、如果没有酶标仪，也可以使用普通的分光光度计测定，但应考虑分光光度计的最小检测体积。

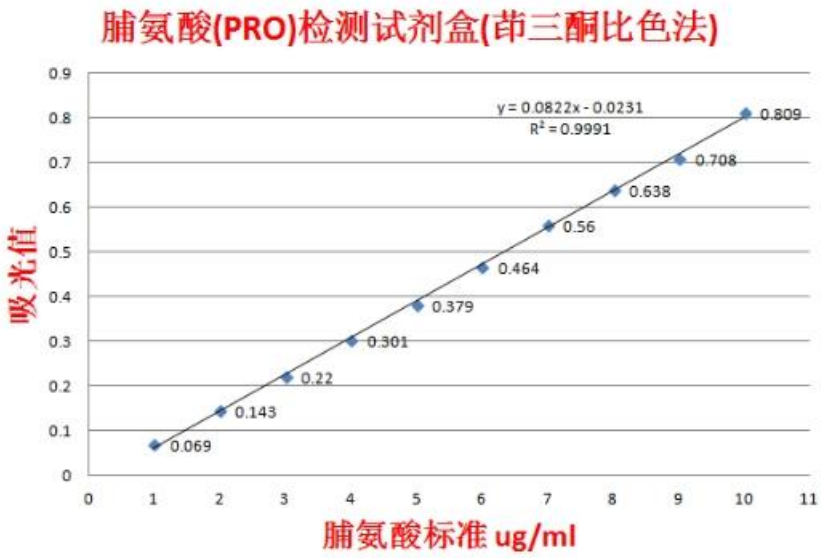
8、测定时不能使用塑料的酶标条或比色皿，因甲苯或二甲苯等有机溶剂与其反应，使测定结果不准确。

9、所测样本的脯氨酸浓度过高，应用 PRO Lysis buffer(1×)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。

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：