

## 脯氨酸（PRO）含量测定试剂盒说明书

（货号：G0111F 分光法 48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 60mL×1 瓶 | 4℃保存 | 使用前摇匀                     |
| 试剂一  | 液体 30mL×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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、冰醋酸、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 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 520nm，蒸馏水调零。

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                               | 300 |           |
| 蒸馏水                              |     | 300       |
| 冰醋酸                              | 300 | 300       |
| 试剂一                              | 600 | 600       |
| 置 95℃水浴中加热 30min（盖紧封口，防止盖子爆开水分）， |     |           |

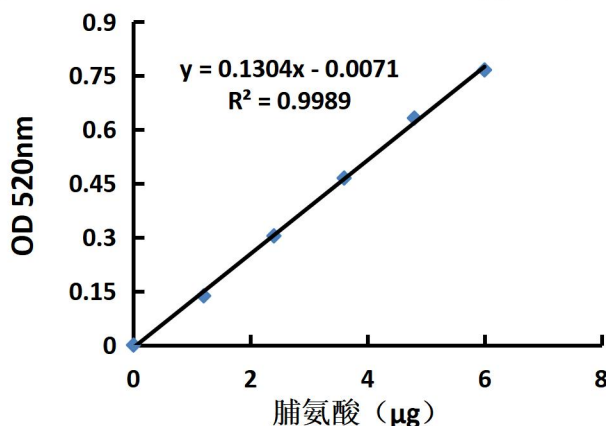
冷却至室温。吸取800 $\mu$ L澄清溶液于 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 520nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A - A_{\text{空白}}$ 。

【注】：1. 吸光度 $\Delta A$  线性范围为 0.01-1.0，若 $\Delta A$  超过 1.0 可减少样本加样量 V1（如减至 150 $\mu$ L，则冰醋酸相应增加），则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。

2. 若 $\Delta A$ 值低于 0.005，可增加样本家养体积 V1（如增至 450 $\mu$ L，则冰醋酸减至为 150 $\mu$ L），或增加样本取样质量 W，可改变后的 V1 和 W 需带入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.1304x - 0.0071$ ；x 为标准品质量（ $\mu$ g），y 为 $\Delta A$ 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned}\text{脯氨酸(Pro)含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0071) \div 0.1304] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 25.6 \times (\Delta A + 0.0071) \div W \times D\end{aligned}$$

3、按液体体积计算：

$$\begin{aligned}\text{脯氨酸(Pro)含量}(\mu\text{g/mL}) &= [(\Delta A + 0.0071) \div 0.1304] \div [V2 \times V1 \div (V + V2)] \times D \\ &= 281.2 \times (\Delta A + 0.0071) \times D\end{aligned}$$

V---提取液的总体积，1mL； V1---加入反应体系提取液的体积，0.3mL；

V2---液体样品量，0.1mL； W---样品质量，g。

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  $\mu$ 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。