

# 脯氨酸 (PRO) 测试盒

(货号: BC143 茚三酮法 50T/48 样)

## 一、测定原理:

植物体内的氨基酸只有脯氨酸能与酸性茚三酮发生反应,生成稳定的红色产物。该产物在 515nm 有一最大吸收高峰,其吸收值与脯氨酸的含量呈直线关系。因此,样品中的脯氨酸含量可用酸性茚三酮法测定。除脯氨酸外,酸性和中性氨基酸不能与酸性茚三酮形成红色产物,碱性氨基酸对这一反应只有轻度干扰,在同类样品的测定中可忽略不计,在不同样品的测定中可加入人造沸石排除这种干扰。

## 二、试剂盒组成及配制: (试剂盒有效期 3 个月)

	组分	试剂规格	保存条件
试剂一	提取液	60mL×2 瓶	4℃避光
试剂二	缓冲液	60mL×1 瓶	4℃避光
试剂三	显色剂	60mL×1 瓶	4℃避光
标准液	100μg/mL 标准贮备液	1mL×1 支	1 个月内使用可 4℃存放, 长时间存放需置 -20℃ 以下
	临用前取 100μg/mL 的标准贮备液 0.5mL 用试剂一一定容至 10mL; 或直接按标准贮备液: 试剂一为 1: 19 的比例进行配制, 配成 5μg/mL 标准液。		

## 三、所需仪器及试剂:

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿, 沸水浴锅, 涡旋混匀器, 离心机。

## 四、操作步骤:

- 前处理:** 精确称取植物组织重量, 按重量 (g): 体积(mL)=1: 9 的比例, 加入 9 倍体积的试剂一, 冰水浴条件下机械匀浆, 制成 10%的组织匀浆液, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测; (上清液需调 2 例进行预试以选取最佳浓度 (选择测定管吸光值在 0.4 左右对应的上清稀释倍数进行正式实验) )

### 2、操作表:

	空白管	标准管	测定管
试剂一 (mL)	0.5		
5μg/mL 标准液 (mL)		0.5	
待测样本 (mL)			0.5
试剂二 (mL)	1	1	1
试剂三 (mL)	1	1	1

95℃ 以上沸水浴反应 30 分钟, 取出冷却, 蒸馏水调零, 1cm 光径, 波长 520nm 处测定各管吸光值 A。

**注:** 本实验可用实验室常规的离心管 (容量 3mL 以上即可) 操作, 沸水浴加热时需要在离心管盖上扎个小孔, 以防气压不稳, 盖子弹开! 操作时注意通风!

## 五、计算公式:

$$\text{脯氨酸含量} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g组织}} \right) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}} \times N$$

$C_{\text{标准}}$ : 标准液浓度, 5 $\mu\text{g/mL}$ ;

$W$ : 组织重量, g;

$V_{\text{样总}}$ : 提取液总体积, mL;

$N$ : 样本测试前稀释倍数。

## 六、计算举例:

分别准确称取正常组、高盐胁迫组的黑麦草叶片各 0.2g, 加入试剂一 1.8mL, 剪碎, 机械匀浆, 制备成 10%的匀浆液, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液, 正常组直接取上清 0.5mL 进行测定, 测得测定管吸光值为 0.514; 高盐胁迫组再用试剂一 10 倍稀释成 1%的浓度, 取样 0.5mL 进行测定, 测得测定管吸光值为 0.471; 同时按操作表操作测得空白管吸光值为 0.004, 标准管吸光值为 0.329, 则计算结果为:

**正常组脯氨酸含量为:**

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸含量} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g组织}} \right) &= \frac{0.514 - 0.004}{0.329 - 0.004} \times 5 \div \frac{0.2}{1.8} \times 1 \\ &= 70.615 \mu\text{g/g组织} \end{aligned}$$

**高盐胁迫组氨酸含量为:**

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸含量} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g组织}} \right) &= \frac{0.471 - 0.004}{0.329 - 0.004} \times 5 \div \frac{0.2}{1.8} \times 10 \\ &= 646.6154 \mu\text{g/g组织} \end{aligned}$$

## 七、注意点:

- 1、操作最好在通风厨内, 戴口罩、手套。
- 2、用试剂一提取后的样本无法用于测定其它指标。
- 3、样本提取后, 其提取液中 PRO 含量若高于 20 $\mu\text{g/mL}$ , 请将该提取液用试剂一稀释一定的倍数后再测, 结果乘以稀释倍数。
- 4、组织匀浆时尽量充分、一致, 以降低样本间提取程度的误差。

## 附录 I :脯氨酸标准曲线的制备

### 1、前处理：

将 100 $\mu$ g/mL 标准品贮备液用试剂一按照 100 倍、50 倍、25 倍、20 倍、12.5 倍、10 倍、5 倍进行稀释后，取 0.5mL 进行测定。

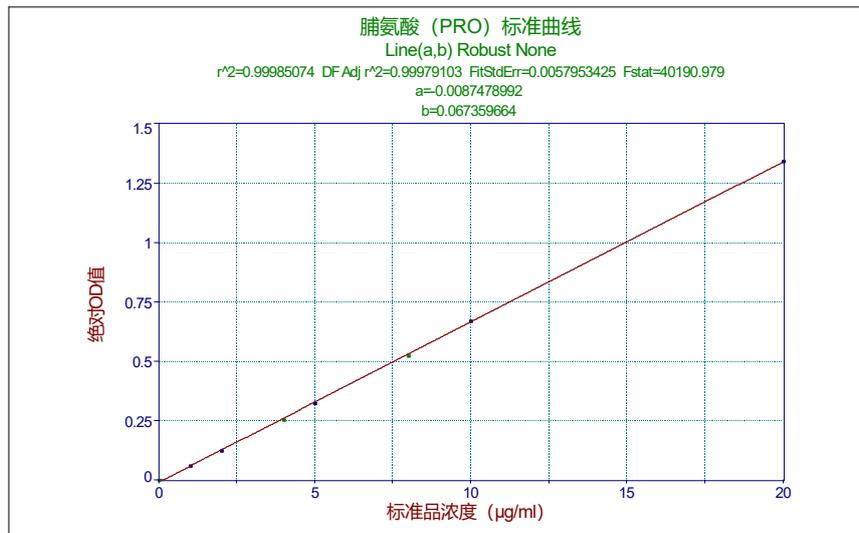
### 2、操作表：

加入物	空白管	标准管
试剂一 (mL)	0.5	
不同浓度脯氨酸标准液 (mL)		0.5
试剂二 (mL)	1	1
试剂三 (mL)	1	1
沸水浴 30 分钟，流水冷却，蒸馏水调零，1cm 光径，波长 520nm 读数。		

### 3、测定结果：

标准品浓度 ( $\mu$ g/mL)	测定吸光值	绝对吸光值
0	0.004	0
1	0.065	0.061
2	0.128	0.124
4	0.258	0.254
5	0.329	0.325
8	0.528	0.524
10	0.673	0.669
20	1.345	1.341

### 4、绘图如下：



注：标准曲线用户可以不画，直接使用计算公式计算即可。