

脯氨酸（PRO）测试盒说明书

（货号：A107-1-1 茚三酮法 50T/48 样）

免责声明：测试前请仔细阅读说明书，预试后再进行批量实验，否则由此导致的后果用户自行承担！

一、测定原理：

植物中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 有最大吸收峰，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、试剂组成与配制：（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：

1、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；（上清液需挑选 2 例左右进行预试以选取最佳浓度（选择测定管吸光值在 0.2~0.4 之间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 处分光光度计测定各管吸光值 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：

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

C_{标准}：标准液浓度，5μg/mL；

W：组织重量，g；

V_{样总}：提取液总体积，mL；

N：样本测试前稀释倍数。

六、注意点：

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

附录：脯氨酸标准曲线的制备（参考）

1、前处理：

将 100μg/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。

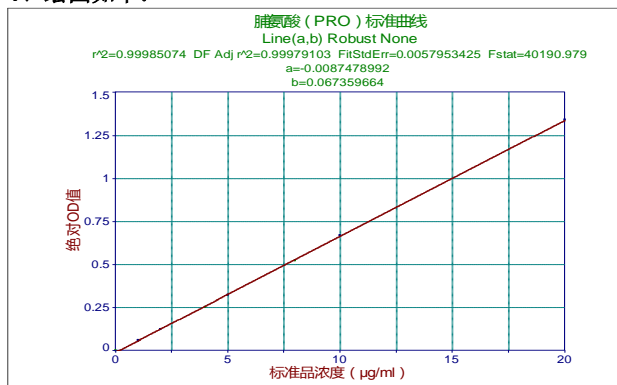
2、操作表：

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 分光光度计测定各管吸光值 A。		

3、测定结果：

标准品浓度（μg/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。如需制作，可按上述做法操作，再将测得的样本测定管吸光值减去空白管吸光值后，代入标准曲线计算，将算得的结果替换计算公式中的 $\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$ 项，再继续运算方可得到最终结果。