（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K177-M

产品规格：48T(22 samples)/96T(46 samples)

检测仪器：酶标仪(510 nm -530 nm)

Elabscience®脯氨酸（Pro）比色法测试盒

Proline (Pro) Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

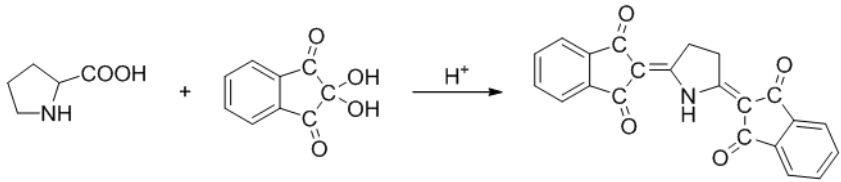
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测植物组织、蜂蜜样本中脯氨酸（Pro）的含量。

检测原理

植物体内的氨基酸只有脯氨酸（Pro）能与酸性茚三酮发生反应，生成稳定的红色产物(如图)。该产物在 520 nm 波长处有一最大吸收峰，其吸收值与脯氨酸的含量呈线性关系。因此，样本中的脯氨酸含量可用酸性茚三酮法测定。



提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	50 mL×3 瓶	60 mL×5 瓶	2-8ºC 避光保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	茚三酮 (Ninhydrin)	3 g×1 瓶	6 g×1 瓶	2-8ºC 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酸试剂 (Acid Reagent)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	2-8ºC 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	100 μg/mL 标准品溶液 (100 μg/mL Proline Standard)	1 mL×1 支	2 mL×1 支	2-8ºC 避光保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂

所需自备物品

仪器：酶标仪（520 nm）、恒温水浴锅（100°C）

试剂：乙酸

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 10 μg/mL标准品配制：

按试剂四：试剂一为1：9的体积比稀释，混匀，现用现配。

③ 反应工作液的配制：

按试剂二（g）：乙酸（mL）：试剂三（mL）= 1: 24: 16比例混匀，搅拌加热溶解（<70°C），冷却后室温避光保存，现配现用。

④ 对照工作液的配制：

乙酸（mL）：试剂三（mL）= 24: 16比例混匀，搅拌均匀，室温避光保存，现配现用。

样本准备

① 样本处理

蜂蜜样本：取新鲜蜂蜜（0.020-1 g），称重，放入试管中，按照重量（g）：体积（mL）=1: 10 的比例加入试剂一，于沸水浴中提取 15 min（摇动试管提取），取出冷却至室温，4°C，10000 × g 离心 15 min，取上清待测。

组织样本：取 0.020 - 1.0 g 新鲜组织块，用双蒸水漂洗，滤纸吸干，称重，放入匀浆容器中，按照重量（g）：体积（mL）=1: 9 的比例加入试剂一，进行匀浆，4°C，10000 × g 离心 15 min，取上清待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.57-35 μg/mL，可参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
朝天椒	10-30	橙子皮/果肉	10-20
胡萝卜	不稀释	生菜	不稀释
绿萝	不稀释	葡萄	不稀释
大蒜	不稀释	黄桃	不稀释
梨	不稀释	李子	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

反应工作液需现配现用。

操作步骤

① 空白管：取 2 mL 试剂一，加入 10 mL 玻璃试管中；
标准管：取 2 mL 10 μg/mL 标准品，加入 10 mL 玻璃试管中；
测定管：取 2 mL 待测样本，加入 10 mL 玻璃试管中。
对照管：取 2 mL 待测样本，加入 10 mL 玻璃试管中。

② 向空白管、标准管和测定管中加入 2 mL 乙酸、2 mL 反应工作液，涡旋混匀。

③ 向对照管加入 2 mL 乙酸、2 mL 对照工作液，涡旋混匀。

④ 试管口用保鲜薄膜扎紧，保鲜膜开小孔，沸水浴 30 min。

⑤ 流水冷却至室温，各管充分混匀后分别取 200 μL 加入到酶标板各对应孔中。

⑥ 在酶标仪 520 nm 处测定各孔 OD 值。

操作表

	空白管	标准管	测定管	对照管
试剂一(mL)	2	--	--	--
10 μg/mL 标准品(mL)	--	2	--	--
待测样本(mL)	--	--	2	2
乙酸(mL)	2	2	2	2
反应工作液(mL)	2	2	2	
对照工作液(mL)				2
涡旋混匀，试管口用保鲜薄膜扎紧，保鲜膜开小孔，沸水浴 30 min。				
流水冷却，各管充分混匀后分别取 200 μL 加入到酶标板对应孔中，在酶标仪 520 nm 处测定各孔 OD 值。				

结果计算

蜂蜜、组织中的脯氨酸（Pro）含量计算公式：

$$\text{脯氨酸含量（μg/g wet weight）} = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times V \div m \times f$$

注解：

ΔA_1：样本 OD 值-对照 OD 值

ΔA_2：标准 OD 值-空白 OD 值

c：标准品浓度（10 μg/mL）

V：加入试剂一的体积，mL

m：样本质量，g

f：样本加入检测体系之前的稀释倍数

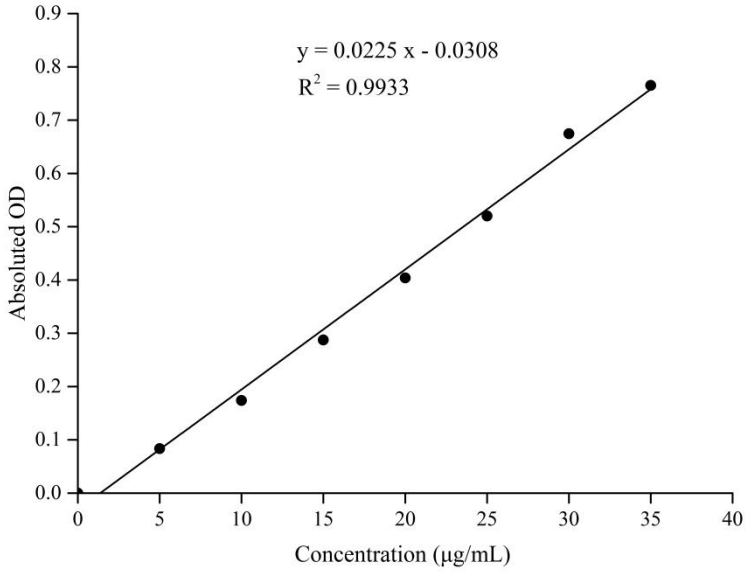
附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.57-35 μg/mL	**批内差**	3.7-5.5%
灵敏度	0.57 μg/mL	**批间差**	4.7-10.0%
回收率	92-104%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

绘制标曲(如下图)



附录2 实例分析

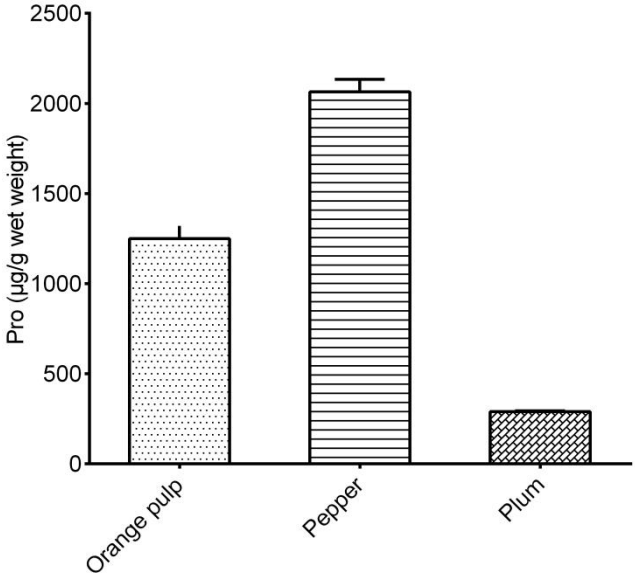
例如检测李子组织(数据仅供参考):

准确称取0.15 g的李子果肉，剪碎后加入1.5 mL的提取液试剂一，匀浆，4°C，10000 × g离心15 min，取2 mL离心后的样本，按操作表操作，结果如下：

空白管平均OD值为0.042，标准管平均OD值为0.188，测定管平均OD值为1.555，对照管平均OD值为1.119，计算结果为：

$$\text{脯氨酸含量（μg/g wet weight）} = \frac{1.555 - 1.119}{0.188 - 0.042} \times 10 \times 1.5 \div 0.15 \times 1 = 298.6\ \mu g/g\ \text{wet weight}$$

按照操作过程，测定橙子果肉（10%组织匀浆，加样量为2 mL）、辣椒（10%组织匀浆，加样量为2 mL）、李子（10%组织匀浆，加样量为2 mL）中Pro含量（如图）：



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录3 客户发表文献

1. Lee H Y, Back K. Melatonin Induction and Its Role in High Light Stress Tolerance in Arabidopsis thaliana[J]. Journal of Pineal Research, 2018. IF:15.221
2. Ho Byoung Chae , Min Gab Kim , Chang Ho Kang , et al. Redox sensor QSOX1 regulates plant immunity by targeting GSNOR to modulate ROS generation[J]. Molecular Plant, 2021 Aug; 14:1312. IF:13.164
3. Adhikari B, Adhikari M, Ghimire B, et al. Cold plasma seed priming modulates growth, redox homeostasis and stress response by inducing reactive species in tomato (Solanum lycopersicum)[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2020, 156: 57-69. IF:7.376
4. Naseh A, Shirin B, Maryam M,et al.Attenuation of chronic arsenic neurotoxicity via melatonin in male offspring of maternal rats exposed to arsenic during conception: Involvement of oxidative DNA damage and inflammatory signaling cascades[J]. Life Sciences 266 (2021) 118876. IF:5.037
5. Liu S Y, Yi S C, Qiu Z X, et al. Bruceine D, the main active ingredient of Brucea javanica (L.) residue inhibits the germination of Bidens pilosa L. seeds by suppressing phenylpropanoid biosynthesis[J]. Industrial Crops and Products, 2021. IF:4.633
6. Darband S G, Sadighparvar S, Yousefi B, et al. Quercetin attenuated oxidative DNA damage through NRF2 signaling pathway in rats with DMH induced colon carcinogenesis[J]. Life sciences, 2020(253-). IF:3.708
7. Otie V, Udo I, Shao Y, et al. Salinity Effects on Morpho-Physiological and Yield Traits of Soybean (Glycine max L.) as Mediated by Foliar Spray with Brassinolide. Plants (Basel). 2021; 10 (3). IF:2.2Jung D S, Son Y J, Shin J M, et al. Gymnaster Koraiensis Extract Alleviated Metabolic Syndrome Symptoms and Stimulated UCP1-Independent Energy Consumption via AMPK Activation in White Adipose Tissue[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2020. IF:5.30