

(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-S

产品规格: 50 assays(48 samples)/ 100 assays(96 samples)

检测仪器: 紫外-可见光分光光度计 (520nm)

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。

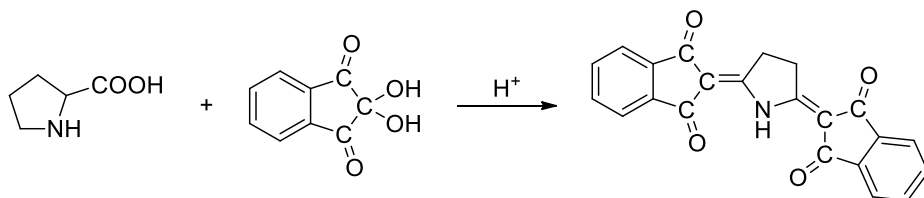
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测检测植物组织、蜂蜜样本中脯氨酸的含量。

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) (50 assays)	规格 2 (Size 2) (100 assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	50 mL×3 瓶	60 mL×5 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	茚三酮 (Ninhydrin)	3 g×1 瓶	6 g×1 瓶	2-8℃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	2-8℃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	2-8℃避光 保存 6 个月

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：紫外-可见分光光度计（520 nm）、恒温培养箱（100℃）

试剂：双蒸水或去离子水、乙酸、甲苯

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 显色剂的配制：

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℃），冷却后避光保存，现用现配。

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℃，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℃，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：0.17-35 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
青椒	不稀释	蜂蜜	不稀释
胡萝卜	不稀释	小白菜	不稀释
绿萝	不稀释	莴苣叶	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

- ① 比色时，比色皿用无水乙醇洗完，不能再用双蒸水洗，水与甲苯不互溶，会影响测定结果。
- ② 显色剂需现用现配。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。
- ② 向步骤①中的各管加入 2 mL 乙酸、2 mL 显色剂，涡旋混匀。
- ③ 试管口用保鲜薄膜扎紧，用针头刺一小孔，沸水浴 30 min，流水冷却。
- ④ 加 4 mL 甲苯，用旋涡混匀仪振荡，静置 10 min。
- ⑤ 分别取 3 mL 上层液，加入相应的 5 mL EP 管中，2325 \times g，离心 10 min。
- ⑥ 吸取上层红色甲苯溶液，520 nm，1 cm 光径石英比色皿，甲苯调零，测定各管吸光度（比色皿用无水乙醇洗完，不要再用双蒸水洗，用待测样本润洗比色皿，直接测定）。

操作表

	空白管	标准管	测定管
试剂一(mL)	2	--	--
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准品(mL)	--	2	--
待测样本(mL)	--	--	2
乙酸(mL)	2	2	2
显色剂(mL)	2	2	2
混匀，沸水浴 30 min，流水冷却，加 4 mL 甲苯，振荡，静置 10 min；取上层液至离心管中，2325 \times g，离心 10 min；吸取上层红色甲苯溶液，520 nm，1 cm 光径石英比色皿，甲苯调零，测定各管吸光度。			

结果计算

蜂蜜、组织中 Pro 计算公式:

$$\text{脯氨酸含量} = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times V \div W \times f$$

($\mu\text{g/g}$)

注解:

ΔA_1 : 样本 OD 值-空白 OD 值

ΔA_2 : 标准 OD 值-空白 OD 值

c: 标准品浓度 (10 $\mu\text{g/mL}$)

V: 加入试剂一的体积

W: 样本质量

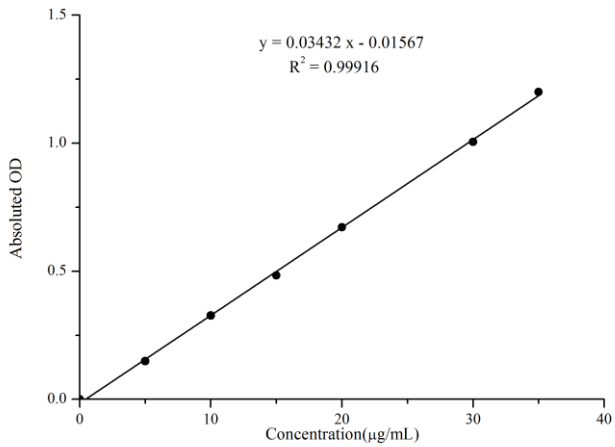
f: 样本加入检测体系之前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.17-35 $\mu\text{g/mL}$	平均批间差	5.4 %
灵敏度	0.17 $\mu\text{g/mL}$	平均批内差	4.5 %
平均回收率	105%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)



附录2 实例分析

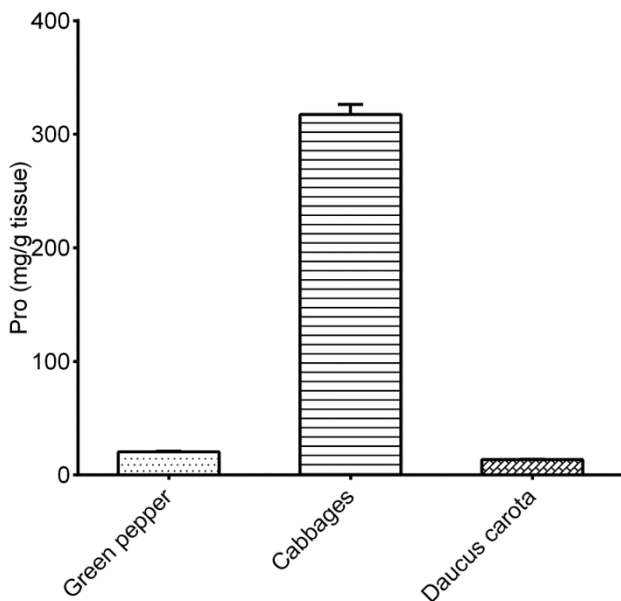
例如检测胡萝卜组织(数据仅供参考):

准确称取0.5 g的胡萝卜, 剪碎后加入5 mL的提取液试剂一, 匀浆, 4°C, 10000 ×g离心15 min, 取上清用试剂一稀释2.5倍, 取2 mL稀释后的样本, 按操作表操作, 结果如下:

空白管平均OD值为0.004, 标准管平均OD值为0.444, 测定管平均OD值为0.065, 计算结果为:

$$\text{脯氨酸含量} (\mu\text{g/g}) = \frac{0.065-0.004}{0.444-0.004} \times 10 \mu\text{g/mL} \times 5 \text{ mL} \div 0.5 \text{ g} \times 2.5 = 34.66 \mu\text{g/g}$$

按照操作过程, 测定青椒(加样量为2 mL)、小白菜(加样量为2 mL)、胡萝卜(加样量为2 mL)中Pro含量(如图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	微量移液器使用不熟练	小心加样,避免液体溅到其它测样管中
	未严格按照说明书操作	严格按照说明书操作
	比色皿用双蒸水洗完直接测定	比色皿用双蒸水清洗完后,要用无水乙醇清洗,再测定
样本和标准品显色很低	水浴时间太短	保证充足的水浴时间
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数,重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本,重新检测

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4 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:5.309

