

吲哚乙酸氧化酶活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10638

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂四	液体 30 mL×1 瓶	4°C保存
试剂五	粉剂×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	-20°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加入 5 mL 蒸馏水备用。
- 2、试剂二：临用前加入 3 mL 蒸馏水备用。
- 3、试剂三：临用前加入 5.71 mL 50%乙醇（乙醇（V）：H₂O（V）=1：1）溶解备用。可以分装后-20°C保存，避免反复冻融。
- 4、试剂五：临用前加入 15 mL 试剂四溶解备用。
- 5、标准品：10 mg 吲哚乙酸。临用前加入 1.14 mL 50%乙醇（乙醇（V）：H₂O（V）=1：1）溶解制成 50 μmol/mL 的标准溶液。可分装后-20°C保存。

产品说明：

吲哚乙酸（IAA）在吲哚乙酸氧化酶的作用下，被氧化破坏失去活性。IAA氧化酶能调节植物体内吲哚乙酸的的水平，从而影响植物的生长。

IAA在无机酸条件下与FeCl₃作用生成红色产物，在530nm下有最大吸收峰。酶活力的大小可用破坏IAA的速率表示。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、乙醇、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 1、组织 称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。12000g 4°C离心 15 分钟，取上清，置冰上待测。

2、细胞或细菌样本的制备: 先收集细胞或细菌样本到离心管内, 弃上清, 按照每 500 万细胞或细菌加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次)。12000g, 4°C离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热30min, 波长调至530nm, 蒸馏水调零。
- 2、将标准溶液用蒸馏水稀释为0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125 μmol/mL的标准液。
- 3、加样表:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
提取液	40	40	-	-
试剂一	8	8	-	-
试剂二	8	8	-	-
试剂三	16	16	-	-
样本	8	-	-	-
上述试剂混匀后30°C水浴反应30min。			-	-
试剂四	80	80	80	80
样本	-	8	-	-
标准品	-	-	80	-
蒸馏水	-	-	-	80
10000g 常温离心10min, 取上清液。			-	-
上清液	130	130	-	-
标准品混合液			130	130
试剂五	70	70	70	70
30°C避光放置30min, 之后分别测量530nm处的吸光值, 分别记为A测定管、A对照管、A标准管、A空白管, 计算 $\Delta A = A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。				

三、吲哚乙酸氧化酶酶活计算

1、标准曲线的绘制:

以标准液的浓度为x轴, 对应的 ΔA 标准为y轴绘制标准曲线, 得到标准方程 $y = kx + b$, 将 ΔA 带入方程中计算得x (μmol/mL)。

2、吲哚乙酸氧化酶活力计算:

(1) 按蛋白浓度计算:

单位的定义: 每mg组织蛋白在反应体系中每分钟消耗1nmol IAA的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{IAA氧化酶酶活 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{酶促}} \times 1000 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 333 \times x \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算:

单位的定义: 每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol IAA的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{IAA氧化酶酶活 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{酶促}} \times 1000 \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 333 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细胞或细菌数量计算:

单位的定义: 每 10^4 个细胞或细菌在反应体系中每分钟消耗1nmol IAA的酶量定义为一个酶活性单位。

IAA氧化酶酶活 (U/10⁴ cell) = $x \times V_{\text{酶促}} \times 1000 \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.667 \times \Delta A$

V_{酶促}: 酶促反应总体积, 0.08mL; 1000: 单位换算系数, 1 μ mol=1000nmol; V_样: 加入的样本体积, 0.008mL; C_{pr}: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; V_{提取}: 提取液体积, 1mL; 500: 500万个细胞; T: 反应时间, 30min。

注意事项:

1、当 ΔA 大于0.4或者A对照管大于1时, 建议将样本用提取液稀释后进行测定; ΔA 过小时, 可增加酶促反应时间(1h或2h)或增加加入的样本体积来测定。

2、试剂一溶解变黑后则不能使用; 试剂二有毒性, 做好防护措施。

实验实例:

1. 取 0.1g 红豆加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}} = 0.477 - 0.402 = 0.075$, 带入标曲 $y = 2.7049x - 0.0154$, 得出 $x = 0.0334$, 按样本质量计算酶活得:

IAA 酶活 (U/g 质量) = $333 \times \Delta A \div W = 333 \times 0.0334 \div 0.1 = 111.22$ U/g 质量。