

## 吲哚乙酸氧化酶活性检测试剂盒说明书

微量法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC4105

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 3mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂四	液体 20 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂五	粉剂×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	-20°C保存

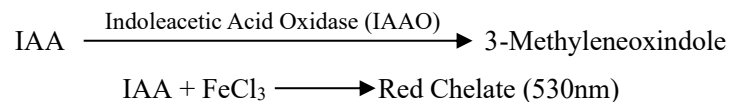
溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加入 5 mL 蒸馏水备用，2-8°C保存两周。
- 2、试剂三：临用前加入 5.71 mL 50% 乙醇（乙醇（V）：H<sub>2</sub>O（V）=1：1）溶解备用。可以-20°C分装保存两周，避免反复冻融。
- 3、试剂五：临用前加入 10 mL 试剂四溶解备用，2-8°C保存两周。
- 4、标准品：10 mg 吲哚乙酸。临用前加入 1.14 mL 50%乙醇（乙醇（V）：H<sub>2</sub>O（V）=1：1）溶解制成 50 μmol/mL 的标准溶液，-20°C分装保存两周，避免反复冻融。

### 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FeCl<sub>3</sub>作用生成红色产物，在530nm下有最大吸收峰。酶活力的大小可用消耗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/超声破碎仪、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℃离心 15min，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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）。12000g，4℃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，分光光度计蒸馏水调零。

2、标准液的稀释：将标准溶液用蒸馏水稀释为0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125 μmol/mL的标准液。

3、标准液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 (μmol/mL)	标准液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 (μmol/mL)
1	50	40	960	2
2	2	80	320	0.4
3	0.4	200	200	0.2
4	0.2	200	200	0.1
5	0.1	200	200	0.05
6	0.05	200	200	0.025
7	0.025	200	200	0.0125

备注：实验中每个标准管需 80μL 标准溶液。

4、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	-	-	-
上述试剂混匀后置于30℃水浴锅中准确反应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，取上清液待测（标准管和空白管无需离心，直接混匀各取130μL进行下述实验）				
上清液	130	130	-	-
标准品混合液	-	-	130	-
空白管混合液	-	-	-	130
试剂五	70	70	70	70
置于30℃水浴锅中避光放置30min，测定530nm处的吸光值，分别记为A测定、A对照、A标准、A空白，计算ΔA测定=A对照-A测定，ΔA标准=A标准-A空白。每个测定管需设一个对照管。标准曲线和空白管只需测1-2次。				

## 三、吡啶乙酸氧化酶酶活计算

1、标准曲线的绘制：

以标准液的浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ ) 为x轴, 对应的 $\Delta A$ 标准为y轴绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$ , 将 $\Delta A$ 测定带入方程中计算得到样本浓度 ( $x$ ,  $\mu\text{mol/mL}$ )。

## 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。

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

### (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。

$$\text{IAA氧化酶酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{酶促}} \times 1000 \div (N \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 333 \times x$$

$V_{\text{酶促}}$ : 酶促反应总体积, 0.08mL; 1000: 单位换算系数, 1 $\mu\text{mol}$ =1000nmol;  $V_{\text{样}}$ : 加入的样本体积, 0.008mL;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度, mg/mL;  $W$ : 样本质量, g;  $V_{\text{提取}}$ : 提取液体积, 1mL;  $N$ : 细胞数量, 以万计;  $T$ : 反应时间, 30min。

## 注意事项:

1、当 $\Delta A$ 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;  $\Delta A$ 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。注意同步修改计算公式。

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  $\Delta A$  测定=A 对照-A 测定=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:

$$\text{IAA 酶活 (U/g 质量)} = 333 \times x \div W = 333 \times 0.0334 \div 0.1 = 111.22 \text{ U/g 质量。}$$

## 相关系列产品:

BC4070/BC4075 单宁酶活性检测试剂盒

BC4080/BC4085 肉桂酸-4-羟化酶 (C4H) 活性检测试剂盒

BC4090/BC4095 花青素还原酶 (ANR) 活性检测试剂盒