

吲哚乙酸氧化酶活性检测试剂盒（微量法）

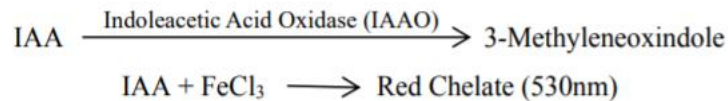
产品货号：BA1864

产品规格：100管/48样

产品简介：

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。

产品组成：

| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 |
|------|-----------|------|
| 提取液 | 液体60mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂一 | 粉剂×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂二 | 粉剂×2瓶 | 2-8℃ |
| 试剂三 | 粉剂×1瓶 | -20℃ |
| 试剂四 | 液体30mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂五 | 粉剂×1瓶 | 2-8℃ |
| 标准品 | 粉剂×1支 | -20℃ |

溶液的配制：

- 试剂一：临用前加入5mL蒸馏水备用，4℃保存两周。
- 试剂二：临用前取1瓶加入3mL蒸馏水备用，4℃保存一周（1瓶粉剂溶解后可做100T，为了延长使用时间，此产品多给1瓶粉剂）。
- 试剂三：临用前加入5.71mL50%乙醇（乙醇（V）：H₂O（V）=1：1）溶解备用。可以-20℃分装保存两周，避免反复冻融。
- 试剂五：临用前加入15mL试剂四溶解备用，2-8℃保存两周。
- 标准品：10mg吲哚乙酸。临用前加入1.14mL50%乙醇（乙醇（V）：H₂O（V）=1：1）溶解制成50 μmol/mL的标准溶液，-20℃分装保存两周，避免反复冻融。

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、超声破碎仪、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，具体比例可参考文献）

- 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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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 |
| | 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各取 130 μL 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 (μmol/mL) 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 带入方程中计算得到样本浓度 (x, μmol/mL)。

2. 吡啶乙酸氧化酶活力计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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 1nmolIAA 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 1nmolIAA 的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{IAA 氧化酶酶活 (U/10}^4\text{cell)} = x \times V_{\text{酶促}} \times 1000 \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.667 \times x$$

V 酶促：酶促反应总体积，0.08mL；1000：单位换算系数， $1 \mu\text{mol}=1000\text{nmol}$ ；V 样：加入的样本体积，0.008mL；Cpr：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。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 ΔA 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：
IAA 酶活 (U/g 质量) = $333 \times x \div W = 333 \times 0.0334 \div 0.1 = 111.22\text{U/g 质量}$ 。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>