

吲哚乙酸氧化酶活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。植物体内吲哚乙酸氧化酶活力的大小，对调节体内吲哚乙酸的水平，起着重要的作用，而影响植物的生长。

测定原理：

在无机酸存在情况下，吲哚乙酸能与 FeCl_3 作用，生成红色螯合物，该物质在 530nm 处有最大吸收峰，酶活力的大小可以其破坏吲哚乙酸的速度表示之。吲哚乙酸的含量可用比色法测定。

自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、可见分光光度计/酶标仪、1.5mL 离心管、微量玻璃比色皿/96 孔板、和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 120mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃保存。

试剂三：液体 10mL×1 瓶，4℃保存。

试剂四：液体 10mL×1 瓶，4℃保存。

试剂五：液体 2mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂六：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。临用前吸取 1mL 试剂五加入试剂六中混匀，待用，避光保存

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 530 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二、试剂三、试剂四置于 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）水浴中保温 20min。
3. 取 1.5mL EP 管若干，按操作依次加入试剂，操作表如下：

	标准管	测定管
试剂二（ μL ）	20	20
试剂三（ μL ）	20	20

试剂四 (μL)	40	40
样本上清液 (μL)	0	20
试剂一 (μL)	120	100
充分混匀后置于 30°恒温水浴中，保温反应 30min。		
实际六 (μL)	400	400
充分混匀，置于 30°C 黑暗水浴保温显色 30min。取 200μL 显色后呈红色的反应液于微量玻璃比色皿/96 孔板中，用分光光度计或酶标仪中测定波长 530nm 处 OD 值，标准管记为 A1，测定管记为 A2		

注意：标准管只需做一次

IAA 氧化酶活性计算公式：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

IAA 标准曲线公式： $y = 1.334x + 0.025$ $R^2 = 0.998$ (x 为 IAA 浓度，mmol/L；y 为吸光值)

(1) 按蛋白浓度计算

酶活定义：从开始时加入的 IAA 量减去酶作用后残留的 IAA 含量，即得被酶所催化的 IAA 含量。以每 mg 酶蛋白在 1h 内分解破坏的吲哚乙酸量表示酶活力大小。

$$U (\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(A1-0.025) \div 1.334 - (A2-0.025) \div 1.334] \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ = 1.5 \times (A1-A2) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

酶活定义：以每 g 样本在 1h 内分解破坏的吲哚乙酸量表示酶活力大小。

$$U (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(A1-0.025) \div 1.334 - (A2-0.025) \div 1.334] \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 1.5 \times (A1-A2) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

酶活定义：以每 1 万个细胞在 1h 内分解破坏的吲哚乙酸量表示酶活力大小。

$$U (\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(A1-0.025) \div 1.334 - (A2-0.025) \div 1.334] \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 1.5 \times (A1-A2) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

酶活定义：以每 mL 酶液在 1h 内分解破坏的吲哚乙酸量表示酶活力大小。

$$U (\mu\text{mol/h/mL}) = [(A1-0.025) \div 1.334 - (A2-0.025) \div 1.334] \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 1.5 \times (A1-A2)$$

V 样总：上清液总体积，1mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，20μL=0.02 mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g，T：反应时间，0.5h。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

IAA 标准曲线公式： $y = 0.667x + 0.025$ $R^2 = 0.998$ (x 为 IAA 浓度，mmol/L；y 为吸光值)

(1) 按蛋白浓度计算

酶活定义：从开始时加入的 IAA 量减去酶作用后残留的 IAA 含量，即得被酶所催化的 IAA 含量。以每 mg 酶蛋白在 1h 内分解破坏的吲哚乙酸量表示酶活力大小。

$$U (\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(A1-0.025) \div 0.667 - (A2-0.025) \div 0.667] \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ = 3 \times (A1-A2) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

酶活定义：以每 g 样本在 1h 内分解破坏的吲哚乙酸量表示酶活力大小。

$$U (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(A1-0.025) \div 0.667 - (A2-0.025) \div 0.667] \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$

$$=3 \times (A1-A2) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

酶活定义：以每 1 万个细胞在 1h 内分解破坏的吲哚乙酸量表示酶活力大小。

$$U (\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(A1-0.025) \div 0.667 - (A2-0.025) \div 0.667] \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 3 \times (A1-A2) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

酶活定义：以每 mL 酶液在 1h 内分解破坏的吲哚乙酸量表示酶活力大小。

$$U (\mu\text{mol/h/mL}) = [(A1-0.025) \div 0.667 - (A2-0.025) \div 0.667] \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 3 \times (A1-A2)$$

V 样总：上清液总体积，1mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，20μL=0.02 mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g，T：反应时间，0.5h。

注意事项：

最低检出限为 0.01μmol/mL。