



## 吲哚乙酸氧化酶活性检测试剂盒

### IAAO Assay Kit

微量法

产品编号: AK519M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

| 编号        | 规格        | 储存条件  |
|-----------|-----------|---|
| AK519-A   | 110mL×1 瓶 | 4℃保存;   |
| AK519-B   | 2mL×1 瓶   | 4℃保存;   |
| AK519-C   | 2mL×1 瓶   | 4℃保存;   |
| AK519-D   | 4mL×1 瓶   | 4℃保存;   |
| AK519-E   | 1mL×1 瓶   | 4℃避光保存;   |
| AK519-F   | 50mL×1 瓶  | 4℃保存; 临用前加入 1ml AK519-E 混匀, 待用, 4℃避光保存两周;                             |
| AK519-标准品 | 粉剂×1 支    | -20℃保存; 临用前加入 1.14 mL 50%乙醇溶解配制成 50umol/mL 的标准溶液, -20℃分装保存两周, 避免反复冻融。 |

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

**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。

**原理:** 在无机酸存在情况下, 吲哚乙酸能与 FeCl<sub>3</sub> 作用, 生成红色螯合物, 该物质在 530nm 处有最大吸收峰, 吲哚乙酸的含量可用比色法测定, 酶活力的大小可以用破坏吲哚乙酸的速度表示。

自备用品:

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

粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g) : AK519-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK519-A) 进行冰浴匀浆。8000g, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。
2. 细胞、细菌: 按照细胞数量 (10<sup>4</sup> 个) : AK519-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK519-A), 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。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 530nm, 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 umol/mL 的标准液。
3. AK519-B、AK519-C、AK519-D 置于 25℃ (一般物种) 或者 37℃ (哺乳动物) 水浴中保温 20min。
4. 在 EP 管中依次加入下列试剂:

| 试剂名称    | 对照管 (ul) | 测定管 (ul) | 标准管 (ul) | 空白管 (ul) |
|---------|----------|----------|----------|----------|
| AK519-B | 20       | 20       |          |          |
| AK519-C | 20       | 20       |          |          |
| AK519-D | 40       | 40       |          |          |
| 上清液     |          | 20       |          |          |

|  |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|
| AK519-A  | 120 | 100 |     |     |
| 充分混匀后置于 30°C 恒温水浴中，保温反应 30min  |     |     |     |     |
| 标准品  |     |     | 100 |     |
| 蒸馏水  |     |     |     | 100 |
| AK519-F  | 400 | 400 | 200 | 200 |
| 置于 30°C 水浴锅中避光放置 30min，吸取 200ul 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 $\Delta A$ 测定=A 对照-A 测定， $\Delta A$ 标准=A 标准-A 空白。<br>注：对照管、标准曲线和空白管各只需检测 1-2 次。 |     |     |     |     |

#### IAA 氧化酶活性计算公式：

##### 1. 标准曲线的绘制：

以标准液的浓度 (umol/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, umol/mL)。

##### 2. 按蛋白浓度计算

酶活定义：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。

$$U (U/mg \text{ prot}) = x \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T \times 1000 = 333.3 x \div Cpr$$

##### 3. 按样本鲜重计算

酶活定义：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。

$$U (U/g \text{ 鲜重}) = x \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \times 1000 = 333.3 x \div W$$

##### 4. 按细胞数量计算

酶活定义：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。

$$U (U/10^4 \text{ cell}) = x \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times \text{细胞数量}) \div T \times 1000 = 333.3 x \div \text{细胞数量}$$

**注：** V 反总：反应总体积：200uL=0.2mL；V 样总：上清液总体积，1mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，20uL=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，30min；1000：单位换算系数，1umol=1000nmol。