



## 吲哚乙酸氧化酶活性检测试剂盒

### IAAO Assay Kit

分光光度法

产品编号: AK519V

产品规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK519-A	70mL×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	1.5mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK519-F	60mL×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 1.2mL 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、1ml 玻璃比色皿、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	40	40		
AK519-C	40	40		
AK519-D	80	80		
上清液		40		

AK519-A	240	200		
充分混匀后置于 30°C 恒温水浴中，保温反应 30min				
标准品			400	
蒸馏水				400
AK519-F	800	800	800	800
置于 30°C 水浴锅中避光放置 30min，吸取 1000ul 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。 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。

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

##### 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：**  $V_{\text{反总}}$ ：反应总体积：400uL=0.4mL； $V_{\text{样总}}$ ：上清液总体积，1mL； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中上清液体积，40uL=0.04 mL； $C_{\text{pr}}$ ：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。