



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: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK519-A	120mL×1 瓶	4℃保存;
AK519-B	10mL×1 瓶	4℃保存;
AK519-C	10mL×1 瓶	4℃保存;
AK519-D	10mL×1 瓶	4℃保存;
AK519-E	2mL×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, 避光保存;

※ 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 FeCl₃ 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、1.5mL 离心管和蒸馏水。

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. 细菌、真菌: 按照细胞数量 (10⁴ 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。
3. 血清等液体: 直接测定。

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. 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。
3. 在 EP 管中依次加入下列试剂:

试剂名称	标准管 (ul)	测定管 (ul)
AK519-B	20	20
AK519-C	20	20
AK519-D	40	40
上清液	0	20
AK519-A	120	100
充分混匀后置于 30° 恒温水浴中, 保温反应 30min。		
AK519-F	400	400

充分混匀，置于 30°C 黑暗水浴保温显色 30min。取 200 μL 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。

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

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。

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

注：V 样总：上清液总体积，1mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，20 μL=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。

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

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。

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

注：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：

1. 最低检出限为 0.01 μmol/mL。