

## 吲哚乙酸氧化酶活性检测试剂盒（紫外分光光度法）

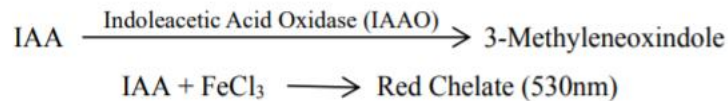
产品货号：BA1865

产品规格：50管/24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FeCl<sub>3</sub>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40mL×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60mL×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：

1. 试剂一：临用前加入5mL蒸馏水备用，4℃保存两周。
2. 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50T，为了延长使用时间，此产品多给1瓶粉剂）。
3. 试剂三：临用前加入5.71mL50%乙醇（乙醇（V）：H<sub>2</sub>O（V）=1：1）溶解备用。可以-20℃分装保存两周，避免反复冻融。
4. 试剂五：临用前加入30mL试剂四溶解备用，2-8℃保存两周。
5. 标准品：10mg吲哚乙酸。临用前加入1.14mL50%乙醇（乙醇（V）：H<sub>2</sub>O（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、低温离心机、水浴锅、超声破碎仪、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、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）

1. 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。
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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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. 可见分光光度计预热30min，波长调至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0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125  $\mu\text{mol/mL}$ 的标准液。
3. 标准液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )	标准液体积 ( $\mu\text{L}$ )	蒸馏水体积 ( $\mu\text{L}$ )	稀释后浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )
1	50	40	960	2
2	2	100	900	0.2
3	0.2	500	500	0.1
4	0.1	500	500	0.05
5	0.05	500	500	0.025
6	0.025	500	500	0.0125

备注：实验中每个标准管需 400 $\mu\text{L}$  标准溶液。

4. 加样表：

试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )	测定管	对照管	标准管	空白管
提取液	200	200	-	-
试剂一	40	40	-	-
试剂二	40	40	-	-
试剂三	80	80	-	-
样本	40	-	-	-
上述试剂混匀后置于 30℃ 水浴锅中准确反应 30min				
试剂四	400	400	400	400
样本	-	40	-	-
标准品	-	-	400	-
蒸馏水	-	-	-	400
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 750 $\mu\text{L}$ 进行下述实验）				
上清液	750	750	-	-
标准品混合液	-	-	750	-
空白管混合液	-	-	-	750
试剂五	400	400	400	400
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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。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、吲哚乙酸氧化酶酶活计算

1. 标准曲线的绘制：

以标准液的浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ ) 为 x 轴，对应的  $\Delta A_{\text{标准}}$  为 y 轴绘制标准曲线，得到标准方程  $y=kx+b$ ，将  $\Delta A_{\text{测定}}$  带入方程中计算得到样本浓度 (x,  $\mu\text{mol/mL}$ )。

2. 吲哚乙酸氧化酶活力计算：

- (1) 按样本蛋白浓度计算：

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：



扫一扫 加微信

**郑州乐业生物科技有限公司**

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

单位的定义：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。

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 1nmol IAA 的酶量定义为一个酶活性单位。

IAA 氧化酶酶活 (U/ $10^4$  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，0.4mL；1000：单位换算系数， $1 \mu\text{mol} = 1000\text{nmol}$ ；V 样：加入的样本体积，0.04mL；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  $\Delta A$  大于 0.5 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； $\Delta A$  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，测得计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}} = 0.800 - 0.668 = 0.132$ ，带入标曲  $y = 4.8418x - 0.042$ ，得出  $x = 0.0359$ ，按样本质量计算酶活得：  
IAA 酶活 (U/g 质量) =  $333 \times x \div W = 333 \times 0.0359 \div 0.1 = 119.55$  U/g 质量。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com