

吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 测定试剂盒说明书

(分光法 24 样)

一、产品简介:

吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 是一种调节植物体内 IAA 水平重要作用的酶, 其活力的大小, 对调节体内 IAA 的水平起着重要的作用, 它氧化分解 IAA 而使其失活, 调节 IAA 水平以保持植物正常生长发育, 从而影响着植物体的生长速度。

吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 活性的大小可以用其破坏 IAA 的速度表示。反应体系中加入定量的 IAA 在 IAAO 作用下形成吲哚醛, 使体系中 IAA 含量减少, 剩余的 IAA 在无机酸存在下与 FeCl_3 作用生成红色螯合物, 可在 530 nm 处比色法测定, 根据空白与酶液中 IAA 含量的差值, 即可计算出 IAAO 活性的大小。

二、试剂盒组成和配制:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|-------------|--------|--|
| 提取液 | 液体 70mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂一 | 液体 5mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂二 | 液体 5mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂三 | 液体 5mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂四 | 液体 1mL×1 支 | 4°C 保存 | |
| | 空瓶×1 个 | | 反应 mix 的制备: 临用前取 0.8mL 试剂四至空瓶中, 再加 40mL 的 35%高氯酸 (14mL 高氯酸 (自备) +26mL 蒸馏水), 混合, 备用, 4°C 保存。 |
| 标准品 | 粉体 mg×1 支 | 4°C 保存 | 若重新做标曲, 则用到该试剂。 |

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵、高氯酸、冰。

四、吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清液待用。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

② 液体样本: 澄清的液体直接检测; 若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 530nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 | 空白管 (仅做一次) |
|-----------|-----|-----|------------|
| 试剂一 | 100 | 100 | 100 |
| 试剂二 | 100 | 100 | 100 |
| 试剂三 | 200 | | 200 |
| 样本 | 100 | 100 | |

| | | | |
|----------------------|-----|-----|-----|
| 提取液 | 500 | 700 | 600 |
| 30℃水浴反应 30min (准确时间) | | | |

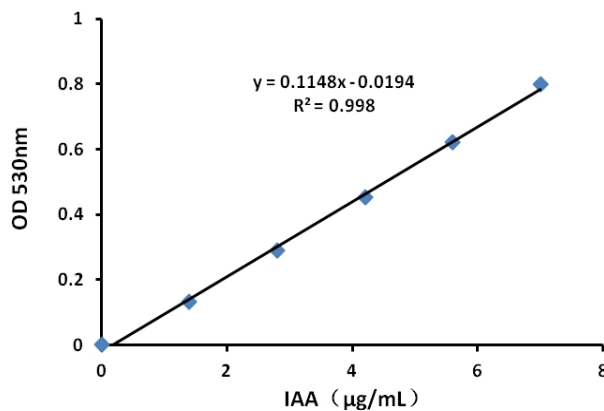
③ 显色反应:

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 上述反应混合液 | 300 | 300 | 300 |
| 反应 mix | 600 | 600 | 600 |
| 30℃避光反应 30min, 于 530nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$ 。 | | | |

【注】若 A 测定管低于 0.2, 则可以缩短反应时间 T (如减至 15min), 或减少加样体积 V1 (如减至 50 μ L), 则改变后反应时间 T 或加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1. 标准曲线: $y = 0.1148x - 0.0194$, x 为标准品浓度($\mu\text{g/mL}$), y 为吸光值 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每小时内分解 1 μg 的 IAA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 活力 } (\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0194) \div 0.1148] \times V2 \div (V1 \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 174.2 \times (\Delta A + 0.0194) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每小时内分解 1 μg 的 IAA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 活力 } (\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0194) \div 0.1148] \times V2 \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 174.2 \times (\Delta A + 0.0194) \div W \end{aligned}$$

4、液体中 IAAO 活力的计算:

单位定义: 每毫升液体每小时内分解 1 μg 的 IAA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 活力 } (\mu\text{g/h/mL}) &= [(\Delta A + 0.0194) \div 0.1148] \times V2 \div V1 \div T \\ &= 174.2 \times (\Delta A + 0.0194) \end{aligned}$$

V---提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.1mL;

V2---水浴步骤反应总体积: 1mL;

T---反应时间, 30min=0.5h;

W---样本质量, g;

Cpr----样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 标准品母液 (1mg/mL): 临用前加 1mL 蒸馏水溶解。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 7, 14, 21, 28, 35 $\mu\text{g/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照空白管反应体系检测, 试剂三换成各个浓度标准品, 根据结果即可制作标准曲

线。