吲哚乙酸氧化酶活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。

测定原理：

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。

自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、可见分光光度计/酶标仪、1.5mL离心管、微量玻璃比色皿/96孔板、和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体120mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：液体10mL×1瓶，4°C保存。

试剂三：液体10mL×1瓶，4°C保存。

试剂四：液体10mL×1瓶，4°C保存。

试剂五：液体2mL×1瓶，4°C避光保存。

试剂六：液体50mL×1瓶，4°C保存。**临用前吸取1mL试剂五加入试剂六中混匀，待用，避光保存**

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4°C离心10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（104个）：试剂一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL试剂一），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°C，离心10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到530 nm，蒸馏水调零。

2. 试剂二、试剂三、试剂四置于25°C（一般物种）或者37°C（哺乳动物）水浴中保温20min。

3. 取1.5mL EP管若干，按操作依次加入试剂，操作表如下：

	标准管	测定管
试剂二（μL）	20	20
试剂三（μL）	20	20

试剂四（μL）	40	40
样本上清液（μL）	0	20
试剂一（μL）	120	100
充分混匀后置于30°恒温水浴中，保温反应30min。		
实际六（μL）	400	400
充分混匀，置于30℃黑暗水浴保温显色30min。取200μL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 R2 = 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（μmol/h/mg prot）=[(A1-0.025) ÷1.334-(A2-0.025) ÷1.334] ×V样÷（V样×Cpr）÷T

=1.5×（A1-A2）÷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（μmol/h/g 鲜重）=[(A1-0.025) ÷1.334-(A2-0.025) ÷1.334] ×V样÷(V样÷V样总×W) ÷T

=1.5×（A1-A2）÷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（μmol/h/104 cell）=[(A1-0.025) ÷1.334-(A2-0.025) ÷1.334] ×V样÷(V样÷V样总×W) ÷T

=1.5×（A1-A2）÷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（μmol/h/mL）=[(A1-0.025) ÷1.334-(A2-0.025) ÷1.334] ×V样÷(V样÷V样总) ÷T

=1.5×（A1-A2）

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。

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 R2 = 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（μmol/h/mg prot）=[(A1-0.025) ÷0.667-(A2-0.025) ÷0.667] ×V样÷（V样×Cpr）÷T

=3×（A1-A2）÷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（μmol/h/g 鲜重）=[(A1-0.025) ÷0.667-(A2-0.025) ÷0.667] ×V样÷(V样÷V样总×W) ÷T

=3×（A1-A2）÷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（μmol/h/104 cell）=[(A1-0.025) ÷0.667-(A2-0.025) ÷0.667] ×V样÷(V样÷V样总×W) ÷T

=3×（A1-A2）÷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（μmol/h/mL）=[(A1-0.025) ÷0.667-(A2-0.025) ÷0.667] ×V样÷(V样÷V样总) ÷T

=3×（A1-A2）

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0.01μmol/mL。