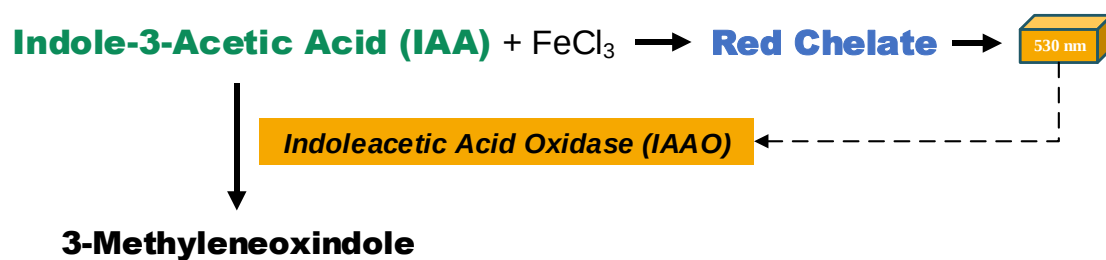




吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 活性检测试剂盒

Indoleacetic Acid Oxidase (IAAO) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 活性检测试剂盒

Indoleacetic Acid Oxidase (IAAO) Activity Assay Kit

一、产品描述

吲哚乙酸 (IAA) 是生长素的主要存在形式, 参与植物体内诸多生理活动, 具有促进种子萌发、扦插生根和诱导花芽分化等重要生理作用, 吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 可将吲哚乙酸氧化从而使其失去活性, 其活性高低对调节体内吲哚乙酸的水平起着重要作用。

吲哚乙酸在酸性条件下能够与 FeCl_3 反应生成红色产物, 产物在 530 nm 处具有最大吸收峰, 通过测定吲哚乙酸的消耗速率即可表征吲哚乙酸氧化酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 5 mL 蒸馏水充分溶解 (配制后 4°C 可保存 2 周, 变黑则停止使用)
试剂二	液体 3 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 5.71 mL 50% (v/v) 乙醇充分溶解 (分装后 -20°C 可保存 2 周, 避免反复冻融)
试剂四	液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂五	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 10 mL 试剂四充分溶解 (配制后 4°C 可保存 2 周)
标准品	粉剂×1 支 (10 mg 吲哚乙酸)	-20°C 保存	使用前加入 1.14 mL 50% (v/v) 乙醇充分溶解 (即为 50 $\mu\text{mol/mL}$ 吲哚乙酸标准液)
标准稀释液的制备: 将 50 $\mu\text{mol/mL}$ 吲哚乙酸标准液使用蒸馏水稀释至 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125 $\mu\text{mol/mL}$ 即为标准稀释液。			

需自备试剂: 无水乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, MW = 46.07, CAS: 64-17-5);

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿 (光径 10 mm) /96 孔板、台式离心机、研钵/匀浆器、可调式移液器、恒温水浴/培养箱、无水乙醇和蒸馏水。

1.粗酶液制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 15 min，取上清液置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），4℃ 12000 g 离心 15 min，取上清液置于冰上待测。

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 530 nm，蒸馏水调零。

②在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	对照组 (μL)	标准组 (μL)	空白组 (μL)
提取液	40	40	-	-
试剂一	8	8	-	-
试剂二	8	8	-	-
试剂三	16	16	-	-
粗酶液	8	-	-	-
充分混匀，30℃准确反应 30 min				
试剂四	80	80	80	80
粗酶液	-	8	-	-
标准稀释液	-	-	80	-
蒸馏水	-	-	-	80
充分混匀，10000 g 常温离心 10 min，取上清液				
在 96 孔板或离心管内依次加入下列试剂：				
上清液	130	130	130	130
试剂五	70	70	70	70
充分混匀，30℃避光显色 30 min				

吸光值测定：测定 530 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 ΔA 测定 = A 对照 - A 测定， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白。注：空白组只需测定 1-2 次，每个样品均需设一个对照组。

标准曲线的建立：以 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125 $\mu\text{mol/mL}$ 为横坐标 (x)，以其对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

3. 吡哆乙酸氧化酶 (IAAO) 活性计算

① 按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol IAA 的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{IAAO (U/mg prot)} = \frac{x \times V_{\text{酶促}} \times 1000}{V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{333 \times x}{\text{Cpr}}$$

② 按组织质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol IAA 的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{IAAO (U/g)} = \frac{x \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{提取}} \times 1000}{V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{333 \times x}{W}$$

③ 按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol IAA 的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{IAAO (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{x \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{提取}} \times 1000}{V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{333 \times x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.008 mL；V 酶促：酶促反应总体积，0.08 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；V 提取：提取液体积，1 mL；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，30 min；1000：单位换算系数，1 μmol =1 nmol。

四、注意事项

- ① 若 ΔA 测定大于 0.4 或 A 对照大于 1.0 时，建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定； ΔA 过小时，可增加酶促反应时间或增加粗酶液添加量后再进行测定，计算时相应修改；
- ② 试剂二具有毒性，实验过程中，需做好防护措施；
- ③ 为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

