

吲哚乙酸氧化酶（IAAO）测定试剂盒说明书

（货号：BP10057F 分光法 24 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 70mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1ml 无水乙醇溶解后，再加 4ml 蒸馏水备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 5ml 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂四	液体 1mL×1 支	4℃避光保存	
	空瓶 1 个		反应 mix 的制备： 1. 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℃保存。
标准品	粉体 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、**高氯酸**、无水**乙醇**、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，12000rpm，4℃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。

③ 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500:1 比例进行提取。

2、检测步骤：

① 分光光度计预热 30min 以上（等待仪器过自检程序亦可），调节波长至 530nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管依次加入：

试剂组分 (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)			

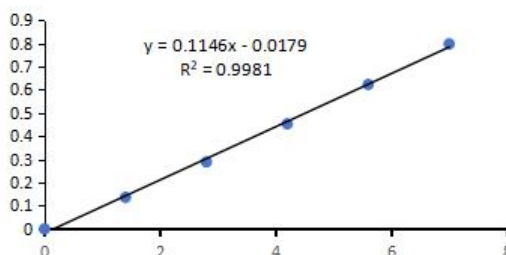
③ 显色反应：

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 50μL)，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： $y = 0.1146x - 0.0179$ ，x 为标准品浓度(μg/mL)，y 为吸光值ΔA。



2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时内分解 1μg 的 IAA 定义为一个酶活力单位。

吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 活力 (μg/h/g 鲜重) = $[(\Delta A + 0.0179) \div 0.1146] \times V_2 \div (W \times V_1 \div V) \div T$
= $174.52 \times (\Delta A + 0.0179) \div W$

3、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 1μg 的 IAA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 活力 } (\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0179) \div 0.1146] \times V_2 \div (V_1 \times C_{pr}) \div T \\ &= 174.52 \times (\Delta A + 0.0179) \div C_{pr}\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 活力 } (\mu\text{g/h/mL}) &= [(\Delta A + 0.0179) \div 0.1146] \times V_2 \div V_1 \div T \\ &= 174.52 \times (\Delta A + 0.0179)\end{aligned}$$

5、按细菌或细胞数量计算:

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。

$$\begin{aligned}\text{吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 活力 } (\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0179) \div 0.1146] \times V_2 \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ &= 0.35 \times (\Delta A + 0.0179)\end{aligned}$$

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;

500---细菌或细胞总数, 万 ;

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 标曲为非必做实验, 用户可根据实验需求制作标曲, 亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算;
- 2 制备标准品母液 (1mg/mL): 标准管中临用前加 1mL 蒸馏水, 充分溶解;
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 7, 14, 21, 28, 35 $\mu\text{g/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 100 μL , 加入 2.76mL 蒸馏水, 混匀得到 35 $\mu\text{g/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{g/mL}$	0	7	14	21	28	35
标品稀释液 μL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 μL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据空白管的加样表操作, 试剂三换成各个浓度标准品, 根据结果, 以 0 浓度吸光值减去各浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
试剂一	100	100
试剂二	100	100
标注品	200	
蒸馏水		200
提取液	600	600
30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 30min (准确时间)		

显色反应:

上述反应混合液	300	300
反应 mix	600	600
30℃避光反应 30min, 于 530nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A_0$ 浓度-A 标准。		