吲哚乙酸氧化酶检测试剂盒(IAA 微板法)

产品简介:

植物体内生长素的种类很多，其中吲哚乙酸(IAA)是植物体内普遍存在的一种生长素，植物体内 IAA 的含量，对于植物的生长、发育、衰老、脱落等均有重要意义。植物体内存在吲哚乙酸氧化酶(Indoleacetic acid oxida-se)，该酶是植物体内一种氧化分解吲哚乙酸的酶，吲哚乙酸氧化酶能够氧化 IAA 使其失去活性，从而调节体内 IAA 的水平，影响植物的生长。

吲哚乙酸氧化酶检测试剂盒(IAA 微板法)检测原理是吲哚乙酸在吲哚乙酸氧化酶作用下形成吲哚醛，使体系中吲哚乙酸含量减少，剩余的吲哚乙酸在无机酸存在下与FeCl3 作用生成红色螯合物，吲哚乙酸氧化酶活性的大小可以用其破坏吲哚乙酸的速度表示,通过比色法(酶标仪)测定 530nm 处吸光度，根据对照与待测样品中吲哚乙酸含量的差值，计算出吲哚乙酸氧化酶活性水平，主要用于检测植物样本、血清等中吲哚乙酸氧化酶活性，尤其适用于定量测定植物样本吲哚乙酸氧化酶活性。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTE0511 100T	Storage
试剂(A): IAA 标准(200μg/ml)	5ml	4℃ 避光
试剂(B): IAA Lysis Buffer	500ml	RT
试剂(C): IAA Assay Buffer	15ml	4℃ 避光
试剂(D): IAA 显色液	2ml	RT 避光
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、恒温箱或水浴锅、研钵或匀浆器、低温离心机、96 孔板、酶标仪、离心管或试管

2、浓硫酸

操作步骤(仅供参考):

1、准备样品:

①植物样品：将大豆或绿豆等种子置于 30℃中避光萌发 3~4 天，选取生长一致的幼苗，除去子叶和根，留下胚轴作为材料；取胚轴称重，按每 100mg 加入 1ml 预冷的 IAA Lysis Buffer 的比例，冰浴情况下充分匀浆或研磨，4℃ 4000g 离心 20min，留取上清液即为吲哚乙酸氧化酶粗提液，短期 4℃保存待用。

②血浆、血清和尿液样品：血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于该试剂盒的测定，-4℃保存，用于吲哚乙酸氧化酶的检测。

③细胞或组织样品：取恰当细胞或组织裂解液，如有必要用 IAA Lysis Buffer 进行适当匀浆，4℃ 4000g 离心 20min，取上清液，-4℃保存，用于吲哚乙酸氧化酶的检测。

④高活性样品：如果样品中含有较高活性的吲哚乙酸氧化酶，可以使用 IAA Lysis Buffer 工作液进行恰当的稀释。

2、配制 IAA 显色工作液：取适量的 IAA 显色液，按 IAA 显色液：蒸馏水：浓硫酸=1：4：6 的比例混合，即为 IAA 显色工作液，4℃密闭保存，即配即用，不易久置。注意：浓硫酸为强腐蚀性物质，操作须极其小心。

3、稀释 IAA 标准溶液：取适量的 IAA 标准(200μg/ml)，按下表进行稀释：

加入物(μl)	1	2	3	4	5	6	7	8
IAA 标准(200μg/ml)	5	10	15	20	25	30	35	40
蒸馏水	195	190	185	180	175	170	165	160
IAA 浓度(μg/ml)	5	10	15	20	25	30	35	40

4、样本处理：按照下表设置对照液、测定液，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡。

加入物(μl)	对照液	测定液
IAA Assay Buffer	120	100
待测样品	—	20
IAA Lysis Buffer	40	40
IAA 标准(200μg/ml)	40	40
25℃孵育 30min。		

5、IAA 加样：取 96 孔板，按照下表设置空白孔、对照孔、测定孔，先加入 200μl IAA 显色工作液，再分别加入 50μl 对照液、测定液，小心混匀，置于 40℃避光孵育 30min，使反应液呈红色。如果样品中的吲哚乙酸氧化酶活性过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置 2 平行孔，求平均值。

加入物(μl)	空白孔	标准孔	对照孔	测定孔
IAA 显色工作液	200	200	200	200
蒸馏水	50	—	—	—
系列 IAA 标准(1~8 号)	—	50	—	—
对照液	—	—	50	—
测定液	—	—	—	50

6、IAA 测定：以空白孔调零，以酶标仪测定标准孔、对照孔、测定孔 530nm 处吸光度(记

为 $A_{标准}$、$A_{对照}$、$A_{测定}$)。

计算:

吲哚乙酸氧化酶活性定义：以 1ml 吲哚乙酸氧化酶提取液在 1h 内氧化的吲哚乙酸量(mg)表示酶活力大小。

以 1~8 号系列 IAA 标准溶液浓度(5、10、15、20、25、30、35、40μg/ml)为横坐标，以对应的吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，直接计算直线回归方程。

组织样品的吲哚乙酸氧化酶活性(μg/ml・g・h)={(C_1-C_2)×V×V_T}/(W×t×V_1)

液体样品的吲哚乙酸氧化酶活性(μg/ml・g・h)={(C_1-C_2)×V×V_T}/(W×t×V_1)

式中：C_1=根据标准曲线求得的对照管 IAA 含量(μg/ml)

C_2=根据标准曲线求得的测定管 IAA 含量(μg/ml)

V_T=酶提取液稀释后总体积(ml)=步骤 1 结束时所得酶粗提液体积(ml)

V_1=加样时所用酶的体积(ml)=0.2

V=样本处理时的液体总体积(ml)=5

W=样品鲜重(g)

t=酶反应时间(h)=1

注意事项:

1、 实验材料应尽量新鲜，如取材后不立即使用，应存于-20～-80℃。

2、 待测样品中不能含有磷酸酶抑制剂，同时需避免反复冻融。

3、 如果没有分光光度计，也可以使用普通的酶标仪测定，但应考虑酶标仪的最大检测体积。

4、 IAA 标准(200μg/ml)见光易分解，含有 IAA 的相关操作均应尽量避光操作。

5、 所测样本的浓度过高，应用 IAA Lysis Buffer 工作液稀释样品后重新测定。

有效期: 6 个月有效；低温运输，按要求保存。

相关产品:

产品编号	产品名称
GCCS0201	细胞线粒体分离试剂盒
GCDF0135	组织细胞固定液(4% PFA)
GCDM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
GCNR0001	DEPC 处理水(0.1%)
GCPS0013	RIPA 裂解液(强)
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)
GCTO1013	丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)

