

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 oxidase)，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

名称 \ 编号	ADS061TE0 100T	Storage
试剂(A): IAA 标准(200µg/ml)	5ml	4°C 避光
试剂(B): IAA Lysis Buffer	500ml	RT
试剂(C): IAA Assay Buffer	15ml	4°C 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
- 2、研钵或匀浆器
- 3、离心管或试管
- 4、低温离心机
- 5、浓硫酸
- 6、96孔板
- 7、酶标仪

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°C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°C4000g离心20min, 留取上清液即为吲哚乙酸氧化酶粗提液, 短期4°C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°C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°C4000g离心20min, 取上清液, -4°C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°C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°C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°C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) = $\{(C_1 - C_2) \times V \times V_T\} / (W \times t \times V_1)$

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

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) = 0.02

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免光操作。
- 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。低温运输，按要求保存。