

细胞分裂素氧化酶（Cytokinin Oxidase, CKO/CKX）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-QT018 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

细胞分裂素氧化酶（CKO/CKX, EC 1.5.99.12）既能特异性催化细胞分裂素类异戊二烯侧链的不饱和键，又能控制 CK 的合成与降解以稳定植物体内 CK 的含量，是目前发现的唯一可促进内源 CK 降解的关键酶。

细胞分裂素氧化酶（CKO/CKX）催化底物进一步还原 2,6-二氯酚靛酚（DCPIP），使该物质在 600nm 处的吸光值减小，通过检测 600nm 处的下降速率进而得到 CKO/CKX 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	粉体 1 支	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 1.1mL 蒸馏水溶解，并用蒸馏水稀释 10 倍待用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 1 支	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 1.1mL 无水乙醇溶解待用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 14mL×1 瓶	4℃保存	

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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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 取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，4℃×12000rpm 离心 15min，取上清液待测。

【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 的比例提取

② 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/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 600nm，所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ② 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	140
样本	40
混匀, 室温 (25℃) 下, 10s 时立即于 600nm 处读取 A1, 5min 后读取 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】 1. 若 A1 值小于 0.3，则可减少样本加样体积 V1（如减至 20μL，试剂三相应增加），则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若 ΔA 的值在零附近徘徊，可增加样本加样体积 V1（如增至 80μL，试剂三相应减少），或延长反应时间 T（如由 5min 后读取 A2 延至 10min），则改变后的 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟还原 1nmol 的 2,6-二氯酚靛酚（DCPIP）定义为一个酶活力单位。

$$\text{CKO/CKX 活力}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 95.24 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟还原 1nmol 的 2,6-二氯酚靛酚（DCPIP）为一个酶活力单位。

$$\text{CKO/CKX 活力}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 95.24 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

3、按液体体积计算：

酶活定义：每克组织每分钟还原 1nmol 的 2,6-二氯酚靛酚（DCPIP）定义为一个酶活力单位。

$$\text{CKO/CKX 活力}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 95.24 \times \Delta A$$

4、按细菌或细胞数量计算：

酶活定义：每克组织每分钟还原 1nmol 的 2,6-二氯酚靛酚（DCPIP）定义为一个酶活力单位。

$$\text{CKO/CKX 活力}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 95.24 \times \Delta A \div 500$$

ϵ ---2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$ ；

d---96 孔板光径，0.5cm；

V--- 加入提取液体积，1mL；

V1--- 加入样本体积，0.04mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，5min；

W---样本质量，g；

500---细胞或细菌总数，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。