# 吲哚乙酸氧化酶（IAAO）检测试剂盒（微量法）

货　　号：PMK1257BKM
规　　格：48T/24S 96T/48S
检测方法：比色法
储存条件：4℃避光保存 6 个月

建议正式实验前，选取 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验，如果样本吸光值不在检测范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

## 一、产品简介

**研究背景：**吲哚乙酸（IAA）在吲哚乙酸氧化酶（IAAO）的作用下，被氧化破坏失去活性。植物体内吲哚乙酸氧化酶活力的大小，对调节体内吲哚乙酸的水平，起着重要的作用，而影响植物的生长。

**检测原理**：本试剂盒提供了一种简单易用的比色法，用于分析各种生物样品中吲哚乙酸氧化酶（IAAO）的活性。其原理是在无机酸存在情况下，吲哚乙酸能与 $FeCl_3$ 作用，生成红色螯合物，该物质在 530nm 处有最大吸收峰，酶活力的大小可以其破坏吲哚乙酸的速度表示之。吲哚乙酸的含量可用比色法测定。

**检测意义**：生长素代谢动力学研究、保鲜/抗逆制剂筛选、衰老脱落效应评价。

**适用样本**：植物组织、细菌、真菌

## 二、产品内容

| 试剂盒组分 | 规格 | | 储存条件 |
|---|---|---|---|
| | 48T | 96T | |
| 试剂一 | 60mL | 120mL | 4℃保存 |
| 试剂二 | 2.5mL | 5mL | 4℃避光保存 |
| 试剂三 | 2.5mL | 5mL | 4℃保存 |
| 试剂四 | 粉剂×1 支 | 粉剂×2 支 | 4℃保存 |
| 试剂五 | 1mL | 2mL | 4℃保存 |
| 试剂六 | 25mL | 50mL | 4℃保存 |
| 标准品 | 粉剂×1 支 | 粉剂×2 支 | 4℃保存 |

## 三、需自备的仪器和用品

酶标仪或可见光分光光度计（能测 530nm 处的吸光度）及水浴锅、96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头、离心机、制冰机、去离子水、50%乙醇、匀浆器。

## 四、试剂准备

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂四：临用前每支先用 1mL 无水乙醇溶解，溶解完全后加入 4mL 去离子水，混匀。用不完的试剂可 4℃保存一周，或分装-20℃保存一个月。

试剂五：即用型；使用前，平衡到室温；分装-20℃避光保存。

试剂六：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

工作液配制：临用前按吸取 0.75mL 试剂五加入 25mL 试剂六混匀的比例配制。用不完的试剂可 4℃避光保存一周，尽量现用现配，用多少配多少。

标准品：每支标准品含 10mg 的吲哚乙酸（IAA），临用前加入 1.14 mL 50%乙醇溶解制成 50μmol/mL 的标准溶液。用不完的试剂可 4℃保存一周，或分装-20℃保存一个月。

标准曲线设置： 使用 50μmol/mL（50,000 nmol/mL）标准溶液，按照下表所示，进一步稀释标准品：

| | 标准品体积（μL） | 去离子水体积（μL） | 标准品浓度(nmol/mL) |
|---|---|---|---|
| Std.1 | 40μL 50μmol/mL | 360 | 5000 |
| Std.2 | 200μL of Std.1 | 200 | 2500 |
| Std.3 | 200μL of Std.2 | 200 | 1250 |
| Std.4 | 200μL of Std.3 | 200 | 625 |
| Std.5 | 200μL of Std.4 | 200 | 312.5 |
| Std.6 | 200μL of Std.5 | 200 | 156.25 |
| Std.7 | 200μL of Std.6 | 200 | 78.13 |

⚠ **注意：每次实验，请使用新配制的标准品。**

## 五、样本制备

**动植物组织：**称取约 0.1g 样本，加入 1mL 试剂一冰浴匀浆，12,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

**细菌或真菌：**收集 500 万细菌或真菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 试剂一，超声波破碎细菌或真菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），12,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

⚠ **注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。 如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。**

## 六、实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 530nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 试剂二、试剂三、试剂四置于 30℃水浴中保温 20min。
3. 取 200μL 左右的处理好的样本上清到 EP 管中，煮沸 5min 灭活酶类（盖紧密封，防止水分散失），12,000g，离心 10min，再取上清液作为样本对照。
4. 样本测定：在 96 孔板或 EP 管中依次加入下列试剂

| | 标准（μL） | 空白（μL） | 测定（μL） | 对照（μL） |
|---|---|---|---|---|
| 试剂二 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 试剂三 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 试剂四 | 0 | 0 | 20 | 20 |
| 样本 | 0 | 0 | 10 | 10（煮沸） |
| 试剂一 | 70 | 70 | 50 | 50 |
| 迅速混匀，放入 30℃准确孵育 40min | | | | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 标准品 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| 去离子水 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| 工作液 | 200 | 200 | 200 | 200 |

充分混匀，放入 30℃避光保温显色 30min，96 孔板直接测定，或取 200μL 显色后呈红色的反应液于微量比色皿中，530nm 处测定吸光值 A，计算$\Delta A_{测}=A_{对照}-A_{测定}$，$\Delta A_{标}=A_{标准}-A_{空白}$。每个测定管需设一个对照，空白和标准曲线只需要测一次。

⚠ **注意：如果预实验发现$\Delta A_{测}$小于 0.001 可延长酶促反应时间或适当加大样本量，注意调整计算公式。如果$\Delta A_{测}$大于 1.0，样本可用试剂一进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。**

## 七、结果计算

1. 标准曲线的绘制：

以标准品浓度为 y 轴，$\Delta A_{标}$为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将$\Delta A_{测}$带入方程计算出 y 值（nmol/mL）。从开始时对照管加入的 IAA 量减去测定管中酶作用后残留的 IAA 含量，即得被酶所催化的 IAA 含量。

2. 样本吲哚乙酸氧化酶（IAAO）活性计算

（1）按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmol IAA 定义为一个酶活性单位 U。

IAAO 活性(U/g 质量)=$(y\times V_{反总})\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\div T=0.25\times y\div W$

（2）按细菌或真菌数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或真菌在反应体系中每分钟消耗 1nmol IAA 定义为一个酶活力单位 U。

IAAO 活性(U/$10^4$ cell)=$(y\times V_{反总})\div(500\times V_{样}\div V_{样总})\div T=0.0005\times y$

（3）按蛋白浓度计算

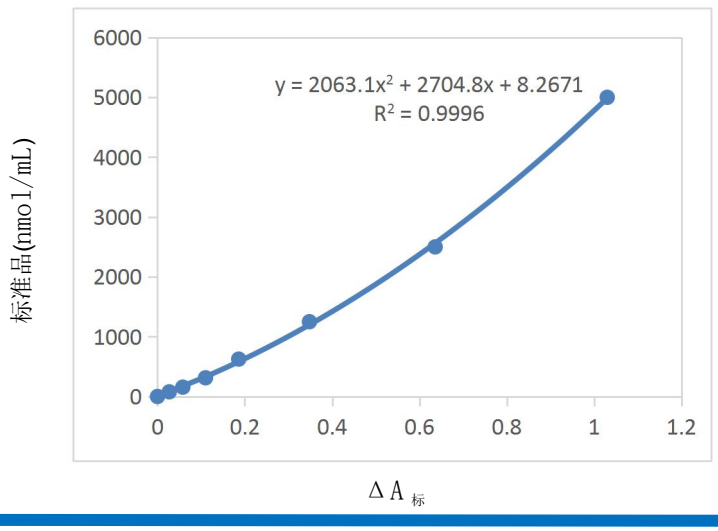
单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟消耗 1nmol IAA 定义为一个酶活力单位 U。

IAAO 活性（U/mg prot）=$(y\times V_{反总})\div(Cpr\times V_{样})\div T=0.25\times y\div Cpr$

$V_{反总}$：反应体系总体积，0.2mL；W：样本质量，g；$V_{样}$：加入样本体积，0.02mL；$V_{样总}$：加入试剂一体积，1mL；T：反应时间，40min；；500：细菌或真菌总数，500 万；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL。

**结果展示**

典型标准曲线



**附录：常见问题与解决方案（FAQ）**

| 问题 | 解决措施 |
|---|---|
| 计算时如果选择合适的计算公式？ | 动物组织及细胞微生物等，可以用质量或者细胞数量计算，也可以建议测蛋白浓度 |
| | 植物可建议用质量计算，也可以建议测蛋白 |
| | 血液或是其他液态样品，可建议用体积计算 |
| | 如客户要购买蛋白含量测定试剂盒，除了说明书强调用考马斯亮蓝法的，通常建议 BCA 法。动植物组织因为蛋白含量高，在 10mg/ml 左右，如果用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度的话通常需要用 PBS 缓冲液等稀释液进行稀释。 |
| 测定时如何进行调零？ | 除说明书中提示用对照管或某种试剂调零外，都用纯水调零。 |
| 试剂盒中样本提取时需要 0.1g 组织，我的样品量不够怎么办？ | 通常可以按比例缩小，如说明书中是约 0.1g 组织加 1ml 试剂一，可以等比例缩小，如 0.05g 组织加 0.5ml 试剂一提取。后续操作不变。 |
| | 对于数量少的样品，一方面可以减少试剂一体积，另一方面还可以延长反应时间。 |

**注意事项**

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

**相关产品：**

PMK1067BKM 多功能氧化酶(MFO)/单加氧酶检测试剂盒（免氯仿/微量法）

PMK1042BKM 葡萄糖氧化酶（GOD）检测试剂盒（微量法）

PMK1033BKS 抗坏血酸氧化酶（AAO）检测试剂盒（分光法）

***更多产品详情了解，请关注公众号：***