

细胞分裂素氧化酶(CKO/CKX)活性测定试剂盒

分光法 48 样

产品简介:

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。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解, 并用蒸馏水稀释 5 倍待用。
试剂二	粉体 mg×1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 1.1mL 无水乙醇溶解待用。
试剂三	液体 28mL×1 瓶	4°C保存	

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、低温离心机、研钵。

细胞分裂素氧化酶 (CKO/CKX) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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°C×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、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 600nm, 蒸馏水调零, 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

② 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	560

混匀, 室温 (25°C) 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 40μL, 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 200μL, 试剂三相应减少), 或延长反应时间 T (如由 5min 后读 A2 延至 10min), 则改变后的 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

结果计算:

1、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。

CKO/CKX 活力(nmol/min/mg prot)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] \div (V1 × Cpr) \div T=66.67 × ΔA

÷Cpr

2、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。

CKO/CKX 活力(nmol/min/g 鲜重)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] \div (W $\times V1 \div V$) \div T=66.67 $\times \Delta A \div$

W

ϵ ---2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数, 2.1×10^4 L/mol/cm; d---光径, 1cm;

V---加入提取液体积, 1mL; V1---加入样本体积, 0.1mL;

V2---反应体系总体积, 7×10^{-4} L; T---反应时间, 5min;

W---样本质量, g; 500--细胞或细菌总数, 500 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。