

## 细胞分裂素氧化酶(CKO/CKK)活性测定试剂盒

微板法 96 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 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃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 10 倍待用。
试剂二	粉体 mg×1 支	4℃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 14mL×1 瓶	4℃保存	

### 所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 600nm，所有试剂解冻至室温（25°C）。

② 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	140
样本	40

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 20 $\mu\text{L}$ ，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 $\Delta A$  的值在零附近徘徊，可增加样本加样体积 V1（如增至 80 $\mu\text{L}$ ，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。

## 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)=[ $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9$ ]  $\div (V_1 \times C_{pr}) \div T = 95.24 \times \Delta$

$A \div C_{pr}$

## 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)=[ $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9$ ]  $\div (W \times V_1 \div V) \div T = 95.24 \times \Delta A$   
 $\div W$

$\epsilon$ ---2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数,  $2.1 \times 10^4$  L/mol/cm;  $d$ ---96 孔板光径, 0.5cm;

$V$ ---加入提取液体积, 1mL;  $V_1$ ---加入样本体积, 0.04mL;

$V_2$ ---反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $T$ ---反应时间, 5min;

$W$ ---样本质量, g; 500--细胞或细菌总数, 500 万;

$C_{pr}$ ---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。