

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

(货号: G0151W 微板法 96 样)

一、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。

二、试剂盒的组成和配制:

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	

三、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。

四、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℃×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℃)。
- ② 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (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)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] $\div (V1 \times Cpr) \div T = 95.24 \times \Delta A \div Cpr$

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)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] $\div (W \times V1 \div V) \div T = 95.24 \times \Delta A \div W$

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

d---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， 2×10^{-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。