

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°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 14mL×1 瓶	4°C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°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 (μL)	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, $\Delta A=A1-A2$ 。	

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×Cpr) \div T=95.24× $\Delta A \div$ 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。

$$\text{CKO/CKX 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 95.24 \times \Delta A \div W$$

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

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， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

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。