



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 38577—2020

## 植物激素类次生代谢产物的生物活性测定 指示植物法

Determination of the biological activity for plant hormone-related secondary  
metabolites—Indicator plant method

2020-03-31 发布

2020-03-31 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：中国计量大学、中国标准化研究院、浙江省检验检疫科学技术研究院。

本标准主要起草人：张雅芬、叶子弘、黄超群、马爱进、俞晓平、申屠旭萍、许益鹏、崔海峰、李翼、陈丽、吴娟。





# 植物激素类次生代谢产物的生物活性测定

## 指示植物法

### 1 范围

本标准规定了用指示植物法测定植物激素类次生代谢产物生物活性的方法。  
本标准适用于植物激素类次生代谢产物生长素、细胞分裂素和赤霉素的活性测定。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

### 3 术语、定义和缩略语

#### 3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

##### 3.1.1

**植物激素类次生代谢产物** **plant hormone-related secondary metabolites**

来自植物自身合成的以及通过微生物发酵或化学合成获得的调控植物生长、发育与休眠的活性物质。

##### 3.1.2

**生物活性** **biological activity**

等浓度的植物激素类次生代谢产物与其相对应的标准物促进或抑制植物生长、发育与休眠能力的相对值。

#### 3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

GA<sub>3</sub>:赤霉酸(gibberellic acid)

NAA:萘乙酸(1-naphthylacetic acid)

ZT:玉米素(zeatin)

### 4 原理

一定浓度范围内,植物激素类活性物质的浓度与其促进相应指示植物的特定组织生长或特定物质合成的能力成正比。以标准物 NAA 为参照,根据小麦胚芽鞘相对伸长量和 NAA 浓度对数的线性回归关系得到标准曲线,计算在线性范围内使胚芽鞘的相对伸长程度相当的 NAA 浓度与试样浓度的比值,表示 1 mg/mL 试样所具有的生长素活性;以标准物 ZT 为参照,根据尾穗苋子叶中苋红素合成量和 ZT



## GB/T 38577—2020

浓度对数的线性回归关系得到标准曲线,计算在线性范围内使苋红素合成量相当的 ZT 浓度与试样浓度的比值,表示 1 mg/mL 试样所具有的细胞分裂素活性;以标准物  $GA_3$  为参照,根据大麦种子糊粉层中  $\alpha$ -淀粉酶活性和  $GA_3$  浓度对数的线性回归关系得到标准曲线,计算在线性范围内使诱导产生的  $\alpha$ -淀粉酶活性相当的  $GA_3$  浓度与试样浓度的比值,表示 1 mg/mL 试样所具有的赤霉素活性。

## 5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

## 5.1 小麦种子

小麦(*Triticum aestivum* L.),长麦 6135。当年采收,颗粒饱满,发芽率 $\geq 90\%$ 。

## 5.2 尾穗苋种子

尾穗苋(*Amaranthus caudatus* L.),红色品种。当年采收,颗粒饱满,发芽率 $\geq 90\%$ 。

## 5.3 大麦种子

大麦(*Hordeum vulgare* L.),二棱大麦。当年采收,颗粒饱满,发芽率 $\geq 90\%$ 。

## 5.4 1%次氯酸钠溶液

量取 100 mL 10%次氯酸钠,用水定容至 1 000 mL,临用前配制。

## 5.5 0.1%(W/V)淀粉溶液

称取可溶性淀粉 1.00 g,加水至 50 mL,加热至完全溶解后,再加入磷酸二氢钾 8.16 g,待其溶解后用水定容至 1 000 mL。临用前配制。

5.6  $I_2$ -KI 溶液

称取碘化钾 0.60 g,碘 0.06 g,用 0.05 mol/L 的盐酸溶解并定容至 1 000 mL,临用前配制。

5.7  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 乙酸缓冲液

称取三水合乙酸钠 0.136 g,用水溶解后定容至 1 000 mL,配制成  $1 \times 10^{-3}$  mol/L 的乙酸钠溶液;用移液枪吸取 57  $\mu$ L 乙酸溶液,用水定容至 1 000 mL,配制成  $1 \times 10^{-3}$  mol/L 的乙酸溶液。分别量取 590 mL  $1 \times 10^{-3}$  mol/L 的乙酸钠溶液与 410 mL  $1 \times 10^{-3}$  mol/L 乙酸溶液,混合后,加入 1 g 链霉素,摇匀。

## 5.8 含 L-酪氨酸的磷酸缓冲液

称取 L-酪氨酸 0.20 g,用 5.5 mL 0.5 mol/L 的盐酸溶解;称取十二水合磷酸氢二钠 2.39 g,磷酸二氢钾 0.91 g,用水溶解后定容至 100 mL,配制成 1/15 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.0)。将两者混匀后定容至 500 mL。4  $^{\circ}$ C 保存备用。

## 5.9 磷酸-柠檬酸缓冲液, pH 5.0

称取磷酸氢二钾 1.80 g,柠檬酸 1.02 g,蔗糖 20 g,加入 900 mL 水溶解后用 pH 计测量并调整 pH 至 5.0,用水定容至 1 000 mL,充分混匀后,4  $^{\circ}$ C 保存备用。



### 5.10 NAA

纯度 $\geq 98\%$ 。

### 5.11 GA<sub>3</sub>

纯度 $\geq 98\%$ 。

### 5.12 ZT

纯度 $\geq 98\%$ 。

### 5.13 1 mg/mL NAA 标准贮备液

称取 10.0 mg NAA 标准品,用 0.5 mL 无水乙醇溶解,用水定容至 10 mL,充分混匀后,4 ℃ 冰箱冷藏,保存期 1 个月。

### 5.14 1 mg/mL GA<sub>3</sub> 标准贮备液

称取 10.0 mg GA<sub>3</sub> 标准品,用 0.5 mL 无水乙醇溶解,用水定容至 10 mL,充分混匀后,4 ℃ 冰箱冷藏,保存期 1 个月。

### 5.15 1 mg/mL ZT 标准贮备液

称取 10.0 mg ZT 标准品,用 0.5 mL 无水乙醇溶解,用水定容至 10 mL,充分混匀后,4 ℃ 冰箱冷藏,保存期 1 个月。

### 5.16 NAA 标准工作液

吸取 1 mL 1 mg/mL NAA 标准贮备液,加入至 9 mL 磷酸-柠檬酸缓冲液中,混匀,得  $1 \times 10^{-1}$  mg/mL NAA 溶液。依次 10 倍稀释得  $1.00 \times 10^{-4}$  mg/mL、 $1.00 \times 10^{-5}$  mg/mL、 $1.00 \times 10^{-6}$  mg/mL NAA 标准工作液。吸取 316  $\mu$ L 1 mg/mL NAA 标准贮备液,684  $\mu$ L 磷酸-柠檬酸缓冲液,混匀,得  $3.16 \times 10^{-1}$  mg/mL NAA 溶液。依次 10 倍稀释得  $3.16 \times 10^{-5}$  mg/mL、 $3.16 \times 10^{-6}$  mg/mL NAA 标准工作液。临用前配制。

### 5.17 GA<sub>3</sub> 标准工作液

吸取 1 mL 1 mg/mL GA<sub>3</sub> 标准贮备液,加入至 9 mL 乙酸缓冲液中,混匀,得  $1 \times 10^{-1}$  mg/mL 溶液。依次 10 倍稀释得  $1.00 \times 10^{-3}$  mg/mL、 $1.00 \times 10^{-4}$  mg/mL、 $1.00 \times 10^{-5}$  mg/mL GA<sub>3</sub> 标准工作液。吸取 316  $\mu$ L 1 mg/mL GA<sub>3</sub> 标准贮备液,684  $\mu$ L 乙酸缓冲液,混匀,得  $3.16 \times 10^{-1}$  mg/mL GA<sub>3</sub> 溶液。依次 10 倍稀释得  $3.16 \times 10^{-4}$  mg/mL、 $3.16 \times 10^{-5}$  mg/mL、 $3.16 \times 10^{-6}$  mg/mL GA<sub>3</sub> 标准工作液。临用前配制。

### 5.18 ZT 标准工作液

吸取 1 mL 1 mg/mL ZT 标准贮备液,加入至 9 mL 含 L-酪氨酸的磷酸缓冲液中,混匀,得  $1 \times 10^{-1}$  mg/mL ZT 溶液。依次 10 倍稀释得  $1.00 \times 10^{-3}$  mg/mL、 $1.00 \times 10^{-4}$  mg/mL、 $1.00 \times 10^{-5}$  mg/mL ZT 标准工作液。吸取 316  $\mu$ L 1 mg/mL ZT 标准贮备液,684  $\mu$ L 含 L-酪氨酸的磷酸缓冲液,混匀,得  $3.16 \times 10^{-1}$  mg/mL ZT 溶液。依次 10 倍稀释得  $3.16 \times 10^{-4}$  mg/mL、 $3.16 \times 10^{-5}$  mg/mL ZT 标准工作液。临用前配制。



## 6 仪器设备

- 6.1 离心机:  $10\,000\times g$ 。
- 6.2 紫外分光光度计。
- 6.3 pH 计: 精度 0.01。
- 6.4 电子分析天平: 精度 1 g, 0.01 g, 0.000 1 g。
- 6.5 生化培养箱:  $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 遮光处理。
- 6.6 摇床:  $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 遮光处理。
- 6.7 体式显微镜: 带图像处理系统。
- 6.8 绿光暗室: 波长 492 nm~455 nm。
- 6.9 研磨珠: 直径 1 mm~2 mm。
- 6.10 恒温水浴锅:  $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.11 高速震荡研磨仪。

## 7 样品

### 7.1 样品采集保存

用电子分析天平称量大于 10 mg 从植物、微生物发酵液中提取纯化或化学合成的待测物质纯品, 用 10 mL 乙醇溶解, 记录待测物质浓度  $c_0$  (mg/mL)。然后进行分装,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  低温避光保存, 至少分装 3 份, 其中分装后每小份不少于 1 mL。

用电子分析天平称量约 1 000 mg 供试固态产品, 用 10 mL 产品说明书规定的试剂溶解, 或用量筒量取 10 mL 液态产品, 按产品说明书中说明的待测物质的含量计算待测物质浓度, 记为  $c_0$  (mg/mL)。然后进行分装, 按产品说明书要求保存, 至少分装 3 份, 其中分装后每小份不少于 1 mL。

### 7.2 试样制备

试验时按不同检测对象选择相应的缓冲液(参见附录 A), 在  $1\times 10^{-6}$  mg/mL~ $1\times 10^{-1}$  mg/mL 范围内将样品进行 5 倍或 10 倍梯度稀释, 稀释后浓度记为  $c_n$  (mg/mL)。试样至少制备 3 个浓度梯度, 每个浓度样品至少重复测量 3 次。

## 8 试验步骤

### 8.1 生长素测定

#### 8.1.1 小麦胚芽鞘切段获取

小麦种子用现配 1% 次氯酸钠溶液浸泡杀菌 15 min, 蒸馏水洗净, 重复一次。然后在无光照的  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  生化培养箱中培养至幼苗长约 25 mm~35 mm 时, 选取长度为 25 mm~30 mm 的幼苗株, 从基部取下芽鞘, 在绿光暗室中切去 3 mm~5 mm 顶端, 切取接下来的约 6 mm 切段, 放入磷酸-柠檬酸缓冲液中, 在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  摇床中摇 1.5 h ( $\leq 80\text{ r/min}$ ), 每 0.5 h 换一次溶液。

#### 8.1.2 胚芽鞘长度测量

将获取的胚芽鞘切段置于体式显微镜下测量后记录长度( $L_0$ ), 一对一做好标记后, 分别置于等量的磷酸-柠檬酸缓冲液、不同浓度的 NAA 标准品工作液以及不同浓度的试样溶液中, 生化培养箱  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$



培养 24 h。然后将处理后的胚芽鞘置于体式显微镜下测量并记录长度( $L$ )。计算每个胚芽鞘实际伸长长度  $\Delta L_n$ , 取重复测试结果绝对差值不超过算术平均值的 20% 的 5 组数据。以磷酸-柠檬酸缓冲液处理后胚芽鞘实际伸长长度的平均值  $\Delta L_0$  为对照。

### 8.1.3 标准曲线绘制

参照附录 A 中表 A.1 进行数据测量记录及计算。以  $\Delta L_n/\Delta L_0$  计算标准品工作液处理后胚芽鞘的相对伸长程度, 以 10 为底取标准品工作液浓度的对数值  $x$  为自变量, 以处理后胚芽鞘切断的相对伸长程度为因变量  $y$ , 绘制标准曲线。

### 8.1.4 测量

参照表 A.1 测量并计算试样处理后胚芽鞘的相对伸长程度( $\Delta L_n/\Delta L_0$ )  $y$ ,  $y$  值在标准曲线线性范围的试验视为有效试验, 记录试样浓度  $c_n$ , 无效试验所获得的数据舍去。然后依据有效  $y$  值从标准曲线中计算  $x$ , 按式(1)计算试样中生长素类物质的生物活性, 若有多个有效  $y$  值, 则按式(1)计算后取其平均值。

$$E_{\text{Auxin}} = \frac{c_0 \times 10^x}{c_n} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$E_{\text{Auxin}}$  ——生长素的生物活性, 单位为 E;

$c_0$  ——待测试样的浓度, 单位为毫克每毫升(mg/mL);

$x$  ——标准工作液浓度的对数值;

$c_n$  ——稀释后试样的浓度, 单位为毫克每毫升(mg/mL)。

以 3 次以上独立实验结果的平均值为试样的生长素活性定值, 计算结果保留三位有效数字。

## 8.2 细胞分裂素测定

### 8.2.1 尾穗苋幼苗的获取

将 2 g 左右的尾穗苋种子用现配的 1% 次氯酸钠溶液浸泡杀菌 15 min, 蒸馏水洗净, 重复一次。然后置于 25 °C 生化培养箱吸胀 5 h, 然后平铺在培养皿中用 9 mL 蒸馏水湿润的两层 18 cm 定性滤纸上, 覆膜加盖, 25 °C 黑暗培养 72 h 后选取子叶大小均一的黄化幼苗。

### 8.2.2 苋红素浓度测量

随机选取 30 株黄化幼苗作为一个试验单元, 分别用等量的含 L-酪氨酸的磷酸缓冲液、不同浓度标准品工作液和不同浓度的试样溶液在 25 °C 生化培养箱中诱导培养 48 h, 然后选取大小、颜色相对均一的子叶 40 个转入盛有 1 mL 蒸馏水的 2 mL 离心管中, 加入适量研磨珠, 用高速震荡研磨仪在 50 Hz 频率下震荡研磨 5 min 破碎细胞, 用离心机 10 000 g 离心 5 min 后, 取 0.8 mL 上清液加入事先加好 4.2 mL 蒸馏水的离心管, 以含 L-酪氨酸的磷酸缓冲液调零, 用紫外分光光度计测量, 在波长为 534 nm 和 650 nm 处分别读取光密度值  $OD_{534}$  和  $OD_{650}$ , 计算相减的差数( $OD_{534} - OD_{650}$ ) 记为  $D_n$ , 指示苋红素浓度。计算含 L-酪氨酸的磷酸缓冲液处理后的光密度值的平均值作为对照  $D_0$ 。

### 8.2.3 标准曲线绘制

参照表 A.2 进行数据测量记录并计算, 以  $D_n - D_0$  指示标准品工作液处理后苋红素浓度的增加值。以 10 为底取标准品工作液浓度的对数值  $x$  为自变量, 以苋红素浓度的增加值为因变量  $y$ , 绘制标准曲线。



#### 8.2.4 测量

参照表 A.2 测量并计算试样处理后苋红素浓度的增加值  $y$ ,  $y$  值在标准曲线线性范围的试验视为有效试验, 记录试样浓度  $c_n$ , 无效试验所获得的数据舍去。然后依据有效  $y$  值从标准曲线中计算  $x$ , 按式(2)计算试样中细胞分裂素类物质的生物活性, 若有多个有效  $y$  值, 则按式(2)计算后取其平均值。

$$E_{\text{CTK}} = \frac{c_0 \times 10^x}{c_n} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$E_{\text{CTK}}$ ——细胞分裂素的生物活性, 单位为 E;

$c_0$ ——待测试样的浓度, 单位为毫克每毫升(mg/mL);

$x$ ——标准工作液浓度的对数值;

$c_n$ ——稀释后试样的浓度, 单位为毫克每毫升(mg/mL)。

以 3 次以上独立实验结果的平均值为试样的细胞分裂素活性定值, 计算结果保留三位有效数字。

### 8.3 赤霉素测定

#### 8.3.1 大麦无胚半粒种子的获取

将大麦种子横切两半, 选择无胚的一半, 用现配的 1% 次氯酸钠溶液浸泡杀菌 15 min, 蒸馏水洗净, 重复 1 次。然后于湿润消毒滤纸上 25 °C 吸胀 48 h, 然后在乙酸缓冲液中, 以 50 r/min~100 r/min 摇 1.5 h, 每 0.5 h 换 1 次水, 取出后轻轻吸干备用。

#### 8.3.2 $\alpha$ -淀粉酶活性测量

将已吸胀的 10 个大麦无胚半粒种子作为一个试验单元。分别用 1 mL 的乙酸缓冲液、不同浓度  $\text{GA}_3$  标准品工作液以及不同浓度的试样溶液诱导处理, 在 25 °C 摇床中 60 r/min~100 r/min 震荡培养 24 h。将种子研碎混匀后在离心机中 1 000 r/min 离心 5 min, 使种子碎屑沉淀, 然后吸取上清液 0.4 mL 至新的 10 mL 离心管中, 加入 1.6 mL 0.1% 淀粉溶液, 混匀, 30 °C 水浴 10 min。再加入  $\text{I}_2$ -KI 溶液 2 mL, 蒸馏水定容至 5 mL, 充分摇匀至溶液呈蓝色, 以乙酸缓冲液调零, 用紫外分光光度计测量, 读取每管中溶液的  $\text{OD}_{580}$  值, 指示  $\alpha$ -淀粉酶活性。计算乙酸缓冲液处理后的光密度值的平均值  $D_0$  作为对照。

#### 8.3.3 标准曲线绘制

参照表 A.3 进行数据测量记录并计算, 以  $D_n - D_0$  指示标准品工作液处理后  $\alpha$ -淀粉酶活性的增加值。以 10 为底取标准品工作液浓度的对数值  $x$  为自变量, 以  $\alpha$ -淀粉酶活性的增加值为因变量  $y$ , 绘制标准曲线。

#### 8.3.4 测量

参照表 A.3 测量并计算试样处理后  $\alpha$ -淀粉酶活性的增加值  $(D_n - D_0)y$ ,  $y$  值在标准曲线线性范围的试验视为有效试验, 记录试样浓度  $c_n$ , 无效试验所获得的数据舍去。然后依据有效  $y$  值从标准曲线中计算  $x$ , 按式(3)计算试样中赤霉素类物质的生物活性, 若有多个有效  $y$  值, 则按式(3)计算后取其平均值。

$$E_{\text{GA}} = \frac{c_0 \times 10^x}{c_n} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

$E_{\text{GA}}$ ——赤霉素的生物活性, 单位为 E;



$c_n$  ——稀释后试样的浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

$x$  ——标准工作液浓度的对数值;

$c_0$  ——待测试样的浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL)。

以 3 次以上独立实验结果的平均值为试样的赤霉素活性定值,计算结果保留三位有效数字。

## 9 重复性

在重复性条件下获得的 3 次独立测定结果的绝对值差值不得超过算术平均值的 20%。





附 录 A  
(资料性附录)  
检测数据记录表

A.1 生长素活性检测数据记录见表 A.1。

表 A.1 生长素活性检测数据记录表

测量指标		对照组	NAA 标准品溶液浓度/(mg/mL)					试样溶液浓度/(mg/mL)		
		磷酸-柠檬酸溶液	$1.00 \times 10^{-4}$	$3.16 \times 10^{-5}$	$1.00 \times 10^{-5}$	$3.16 \times 10^{-6}$	$1.00 \times 10^{-6}$	$c_1$	.....	$c_n$
$L_0 1/\mu\text{m}$										
.....										
$L_0 n/\mu\text{m}$										
$L_1/\mu\text{m}$										
.....										
$L_n/\mu\text{m}$										
$\Delta L_1/\mu\text{m}$										
.....										
$\Delta L_n/\mu\text{m}$										
y	$\Delta L_1/\Delta L_0$	—								
	.....									
	$\Delta L_n/\Delta L_0$									
x		—								
标准曲线		—						—		
$E_{\text{Auxin}}$			—							

A.2 细胞分裂素活性检测数据记录见表 A.2。

表 A.2 细胞分裂素活性检测数据记录表

测量指标		对照组	ZT 标准品溶液浓度/(mg/mL)					试样溶液浓度/(mg/mL)		
		含 L-酪氨酸的磷酸缓冲液	$1.00 \times 10^{-5}$	$3.16 \times 10^{-5}$	$1.00 \times 10^{-4}$	$3.16 \times 10^{-4}$	$1.00 \times 10^{-3}$	$c_1$	.....	$c_n$
$OD_{534} 1$										
.....										
$OD_{534} n$										
$OD_{650} 1$										
.....										



活 A.2 (续)

并规化标		定照次	ZT 标准品溶液示物/(mg/mL)					用长溶液示物/(mg/mL)		
		含 L-酪氨测 的磷测 缓冲液	$1.00 \times 10^{-5}$	$3.16 \times 10^{-5}$	$1.00 \times 10^{-4}$	$3.16 \times 10^{-4}$	$1.00 \times 10^{-3}$	$c_1$	.....	$c_n$
$OD_{650} n$										
$D_1$										
.....										
$D_n$										
y	$D_1 - D_0$	—								
	.....									
	$D_n - D_0$									
$x$		—								
标准性活		—						—		
$E_{CTK}$			—							

A.3 大子归计量中并产生记录见细 A.3。

活 A.3 类次植物激代素谢产的生活

并规化标		定照次	GA <sub>3</sub> 标准品溶液示物/(mg/mL)					用长溶液示物/ (mg/mL)		
		素测 缓冲液	$1.00 \times 10^{-5.5}$	$1.00 \times 10^{-5}$	$3.16 \times 10^{-5}$	$1.00 \times 10^{-4}$	$3.16 \times 10^{-4}$	$1.00 \times 10^{-3}$	$c_1$	..... $c_n$
$D_1$										
.....										
$D_n$										
y	$D_1 - D_0$	—								
	.....									
	$D_n - D_0$									
$x$		—								
标准性活		—						—		
$E_{GA}$			—							