



中华人民共和国国家标准

GB/T 38484—2020

植物激素类次生代谢产物的生物活性测定 细胞学评价法

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

2020-11-19 发布

2020-11-19 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、马爱进、俞晓平、黄超群、崔海峰、许益鹏、申屠旭萍、李翼、陈丽、吴娟。



植物激素类次生代谢产物的生物活性测定

细胞学评价法

1 范围

本标准规定了用细胞学评价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 术语和定义、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具有调控植物生长、发育与休眠的活性物质。

3.1.2

生物活性 **biology activity**

单位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。

4-MU:4-甲基伞形酮(4-methylumbelliferon)

4-MUG:4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷(4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide)

AuxRE::GUS:生长素响应 *gus* 报告基因(auxin-responsive *gus* reporter gene)

CTKRE::GUS:细胞分裂素响应 *gus* 报告基因(cytokinin-responsive *gus* reporter gene)

DPBS:Dulbecco's 磷酸缓冲盐溶液(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)

GA₃:赤霉素(gibberellic acid)

GARE::GUS:赤霉素响应 *gus* 报告基因(gibberellin-responsive *gus* reporter gene)

GUS:β-葡萄糖醛酸苷酶(β-glucuronidase)

NAA:萘乙酸(1-naphthylacetic acid)

ZT:玉米素(zeatin)

4 原理

植物激素类活性物质通过与相应的激素受体结合可调节相关蛋白与其靶基因启动子中的激素应答元件结合进而诱导或抑制靶基因表达。选用携带激素响应的 *gus* 报告基因的转基因拟南芥原生质体细胞为试验材料,以标准物为参照,根据 GUS 酶活和标准物浓度对数的线性回归关系得到标准曲线,计算在线性范围内诱导产生的 GUS 酶活相同的标准物浓度与试样浓度的比值,表示单位浓度 (mg/mL) 试样所具有的植物激素类次生代谢产物的生物活性。其中 GUS 蛋白可水解 4-MUG 为 4-MU,由此以 37 °C 水浴条件下每微克 GUS 蛋白每分钟水解 4-MUG 产生的 4-MU 的物质的量来指示 GUS 酶活。

5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.1 水。GB/T 6682 一级。

5.2 AuxRE::GUS 细胞系。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) Columbia (Col-0) 生态型,含有生长素应答元件 AuxREs,携带单拷贝 *gus* 基因,活细胞数 $\geq 1 \times 10^6$ 个/mL。

5.3 GARE::GUS 细胞系。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) Columbia (Col-0) 生态型,含有赤霉素应答元件 TATC-boxs,携带单拷贝 *gus* 基因,活细胞数 $\geq 1 \times 10^6$ 个/mL。

5.4 CTKRE::GUS 细胞系。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) Columbia (Col-0) 生态型,含有细胞分裂素应答元件 ARR1AT,携带单拷贝 *gus* 基因,活细胞数 $\geq 1 \times 10^6$ 个/mL。

5.5 细胞系培养液。不含蔗糖和琼脂的 MS 培养基 4.74 g,加 950 mL 水溶解后,加入 30.00 g 蔗糖,0.75 g 氯化钙,0.35 g 硝酸钾,充分混匀后用氢氧化钠调整 pH 至 5.60,加水定容至 1 000 mL,0.22 μm 滤膜过滤除菌。现配现用。

5.6 DPBS,pH 7.4。称取氯化钠 8.00 g,氯化钾 0.20 g,十二水合磷酸氢二钠 2.90 g,磷酸二氢钾 0.24 g,加水定容至 1 000 mL,混匀后常温保存备用。可使用同类商品化产品。

5.7 抽提液。称取二水合乙二胺四乙酸二钠 3.72 g,加入 700 μL β -巯基乙醇,1 mL 聚乙二醇辛基苯基醚,用 DPBS 溶解并定容至 1 000 mL,混匀后常温保存备用。

5.8 含 1 mmol/L 4-MUG 的抽提液。称量 105.6 mg 4-MUG,用抽提液溶解并定容至 300 mL,现配现用。

5.9 0.2 mg/mL 牛血清蛋白溶液。称量 20.0 mg 牛血清蛋白标准品,用 DPBS 溶解并定容至 100 mL,现配现用。

5.10 反应终止液。称取 21.20 g Na_2CO_3 ,用水溶解并定容至 1 000 mL。

5.11 考马斯亮蓝染色液。称取 0.5 g 考马斯亮蓝 G-250,溶于 50 mL 90% 的乙醇中,并加入 DPBS 100 mL,用水定容至 1 000 mL,混匀后常温保存。有效期一个月。

5.12 10 $\mu\text{mol/L}$ 4-MU 母液。称取 17.6 mg 4-MU,用反应终止液溶解并定容至 10 mL,混匀,得到 10 mmol/L 4-MU 溶液。吸取 1 mL 10 mmol/L 4-MU 溶液加入 9 mL 反应终止液,混匀,得到 1 mmol/L 4-MU 溶液。吸取 100 μL 1 mmol/L 4-MU 溶液加入 9.9 mL 反应终止液混匀,得到 10 $\mu\text{mol/L}$ 4-MU 溶液。4 °C 避光暂存。

5.13 4-MU 使用液。吸取 200 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 4-MU 母液,加入至 9.8 mL 反应终止液中,混匀后得到 200 nmol/L 的 4-MU 使用液。然后吸取 1 mL 200 nmol/L 的 4-MU,加入 1 mL 反应终止液,混匀后得到 100 nmol/L 的 4-MU 使用液,依次两倍稀释,得到 50 nmol/L、25 nmol/L、12.5 nmol/L、6.25 nmol/L 的 4-MU 使用液。

5.14 NAA。纯度 $\geq 98\%$ 。

5.15 GA_3 。纯度 $\geq 98\%$ 。

5.16 ZT。纯度 $\geq 98\%$ 。

5.17 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。

5.18 1 mg/mL GA_3 标准贮备液。称取 10.0 mg GA_3 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。

5.19 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。

5.20 NAA 标准工作液。吸取 200 μL 1 mg/mL NAA 标准贮备液,800 μL 细胞系培养液,混匀,得 2×10^{-1} mg/mL NAA 溶液。依次 10 倍稀释得 2.00×10^{-4} mg/mL、 2.00×10^{-5} mg/mL、 2.00×10^{-6} mg/mL NAA 标准工作液。吸取 632 μL 1 mg/mL NAA 标准贮备液,368 μL 细胞系培养液,混匀,得 6.32×10^{-1} mg/mL NAA 溶液。依次 10 倍稀释得 6.32×10^{-5} mg/mL、 6.32×10^{-6} mg/mL NAA 标准工作液。临用前配制。

5.21 GA_3 标准工作液。吸取 200 μL 1 mg/mL GA_3 标准贮备液,800 μL 细胞系培养液,混匀,得 2×10^{-1} mg/mL GA_3 溶液。依次 10 倍稀释得 2.00×10^{-4} mg/mL、 2.00×10^{-5} mg/mL、 2.00×10^{-6} mg/mL GA_3 标准工作液。吸取 632 μL 1 mg/mL GA_3 标准贮备液,368 μL 细胞系培养液,混匀,得 6.32×10^{-1} mg/mL GA_3 溶液。依次 10 倍稀释得 6.32×10^{-5} mg/mL、 6.32×10^{-6} mg/mL GA_3 标准工作液。临用前配制。

5.22 ZT 标准工作液。吸取 200 μL 1 mg/mL ZT 标准贮备液,800 μL 细胞系培养液,混匀,得 2×10^{-1} mg/mL ZT 溶液。依次 10 倍稀释得 2.00×10^{-3} mg/mL、 2.00×10^{-4} mg/mL、 2.00×10^{-5} mg/mL ZT 标准工作液。吸取 632 μL 1 mg/mL ZT 标准贮备液,368 μL 细胞系培养液,混匀,得 6.32×10^{-1} mg/mL ZT 溶液。依次 10 倍稀释得 6.32×10^{-4} mg/mL、 6.32×10^{-5} mg/mL ZT 标准工作液。临用前配制。

6 仪器设备

6.1 pH 计:精度 0.01。

6.2 电子分析天平:精度 0.1 mg、0.01 g、1 g。

6.3 光照培养箱:25℃ \pm 1℃。

6.4 恒温水浴锅:37℃。

6.5 细胞培养板。

6.6 酶标仪:可同时检测吸光度和荧光强度。

6.7 酶标板:黑色。



7 测定步骤

7.1 试样制备

按供试样品的有效物质(或待测物质)质量换算,称量足量固体样品或量取足量液体样品,按产品使用说明书或待测物质特性选择合适的试剂或水溶解配制有效物质(或待测物质)的溶液作为待测试样,浓度记为 ρ_0 (mg/mL)。待测时用相应缓冲液将待测试样进行 5 倍或 10 倍梯度稀释,稀释后浓度记为 ρ_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三次。

7.2 GUS 蛋白诱导表达水平测定

7.2.1 试样处理诱导 GUS 蛋白表达及样品制备

准备 3 个以上细胞培养板,每个板为一个重复,对每格进行编号,按检测对象选择相应的细胞系和标准物,将 1 mL 的 AuxREs::GUS 细胞系加入细胞培养板的培养孔,每个孔再分别对应加入 1 mL 细胞系培养液、不同浓度的 NAA 标准品工作液和不同浓度的试样溶液,做好标记,25 ℃光照培养箱培养 6 h 进行处理诱导 GUS 表达。然后将处理后的细胞系转移至 10 mL 离心管,加入 1 mL 抽提液混匀后冰上裂解 20 min。4 ℃ 14 000 g 离心 30 min 后吸取上清液即为样品溶液。

7.2.2 样品中总蛋白浓度的测定

分别吸取 0 μL、2.0 μL、4.0 μL、6.0 μL、8.0 μL、12.0 μL、16.0 μL、20.0 μL 标准品牛血清蛋白溶液加入酶标板加样孔中,加 DPBS 溶液补足至 20.0 μL(各孔中牛血清蛋白含量分别为 0 μg、0.40 μg、0.80 μg、0.12 μg、0.16 μg、2.40 μg、3.20 μg、4.00 μg);根据样品中蛋白含量吸取适量样品(体积为 V_1)加入酶标板加样孔中,加 DPBS 溶液补足至 20.0 μL;每个标准品或样品溶液重复加入 3 个加样孔,以 DPBS 溶液为空白对照调零,然后分别加入 200 μL 考马斯亮蓝染色液与标准品或样品溶液混匀,在波长 595 nm 处测量吸光度,以牛血清蛋白含量为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线,并根据式(1)计算样品中总蛋白浓度 $\rho_{\text{总}}$ 。

$$\rho_{\text{总}} = \frac{m}{V_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$\rho_{\text{总}}$ ——样品的总蛋白浓度,单位为微克每微升($\mu\text{g}/\mu\text{L}$);

m ——从标准曲线得到的样品的蛋白质含量,单位为微克(μg);

V_1 ——测蛋白含量时加样的体积,单位为微升(μL)。

计算结果保留至小数点后四位。

7.2.3 样品中 GUS 蛋白酶活测定

取适量样品溶液(使总蛋白含量在 20 μg~200 μg),记录体积 V_2 ,加入 1 mL 含有 1 mmol/L 4-MUG 的抽提液,37 ℃水浴,在水浴 5 min、25 min、45 min、65 min 以及 85 min 时各取出 200 μL 反应液,加入 800 μL 反应终止液混匀后,吸取 200 μL 加入酶标板加样孔。吸取 200 μL 4-MU 使用液(4-MU 含量分别为 200 nmol、100 nmol、50 nmol、25 nmol、12.5 nmol、6.25 nmol),加入酶标板加样孔。注意,每个样品检测酶标板上均需带上标准品,每个标准品或样品溶液重复加入 3 个加样孔,以反应终止液为空白对照调零,在激发波长 365 nm,吸收波长 455 nm 的条件下测量荧光强度。以 4-MU 标准品浓度为横坐标,荧光强度为纵坐标绘制标准曲线,并通过该标准曲线将样品反应后荧光强度换算为样品反应后实际产生的 4-MU 的物质的量,最后以样品反应时间为横坐标,样品反应后产生的 4-MU 的物质的量为纵坐标绘制标准曲线,计算 GUS 蛋白每分钟水解 4-MUG 产生 4-MU 的物质的量 n ,并根据式(2)计算样品中 GUS 酶活 y 。

$$y = \frac{n}{\rho_{\text{总}} \times V_2} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

y ——样品中 GUS 酶活,单位为皮摩尔每分微克[$\text{pmol}/(\text{min} \cdot \mu\text{g})$];

n ——样品中 GUS 蛋白每分钟水解 4-MUG 产生 4-MU 的物质的量,单位为皮摩尔每分(pmol/min);

$\rho_{\text{总}}$ ——样品中总蛋白浓度,单位为微克每微升($\mu\text{g}/\mu\text{L}$);

V_2 ——测 GUS 酶活时的加样体积,单位为微升(μL)。

计算结果保留至小数点后三位。

7.3 标准曲线绘制

按 7.2 所述测定标准品工作液处理后 GUS 蛋白诱导表达水平,并参照附录 A 对数据进行记录。以 10 为底取标准品工作液浓度的对数值 x 为自变量,GUS 酶活 y 为因变量,绘制标准曲线。

7.4 测量

按 7.2 所述测定试样溶液处理后 GUS 蛋白诱导表达水平,并参照附录 A 对数据进行记录。 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 ρ_n ,无效试验所获得的数据应舍去。然后依据有效 y 值从标准曲线中计算 x ,依据式(3)计算试样中植物激素类次生代谢产物的生物活性,若有多个有效 y 值,则按式(3)计算取其平均值。

$$E = \frac{2\rho_0 \times 10^x}{\rho_n}$$

.....(3)

式中:

- E ——植物激素类次生代谢产物的生物活性;
- ρ_0 ——待测试样的浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);
- ρ_n ——稀释后待测试样的浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);
- x ——标准工作液浓度的对数值。

以三次以上独立实验结果的平均值为试样中含有的植物激素类次生代谢产物的生物活性定值,计算结果保留三位有效数字。

8 重复性

在重复性条件下获得的三次独立测定结果的绝对值差值不得超过算数平均值的 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

检测指标		对照组	NAA 标准品工作液					试样溶液			
			mg/mL					mg/mL			
		细胞系培养液	2.00×10^{-4}	6.32×10^{-5}	2.00×10^{-5}	6.32×10^{-6}	2.00×10^{-6}	ρ_1	\cdots	ρ_n	
试验溶液实际浓度		0	1.00×10^{-4}	3.16×10^{-5}	1.00×10^{-5}	3.16×10^{-6}	1.00×10^{-6}	$\rho_1/2$	\cdots	$\rho_n/2$	
蛋白浓度标准曲线											
OD ₅₉₅	1										
	\cdots										
	n										
总蛋白 浓度 $\rho_{\text{总}}$	1										
	\cdots										
	n										
n	1										
	\cdots										
	n										
GUS 酶活 y	1	—									
	\cdots										
	n										
标准曲线									—		
x		—									
E_{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

检测指标		对照组	ZT 标准品工作液					试样溶液		
			mg/mL					mg/mL		
		细胞系培养液	2.00×10^{-3}	6.32×10^{-4}	2.00×10^{-4}	6.32×10^{-5}	2.00×10^{-5}	ρ_1	...	ρ_n
试验溶液实际浓度		0	1.00×10^{-3}	3.16×10^{-4}	1.00×10^{-4}	3.16×10^{-5}	1.00×10^{-5}	$\rho_1/2$...	$\rho_n/2$
蛋白浓度标准曲线										
OD ₅₉₅	1									
	...									
	n									

表 A.2 (续)

检测指标		对照组	ZT 标准品工作液 mg/mL					试样溶液 mg/mL		
		细胞系培养液	2.00×10^{-3}	6.32×10^{-4}	2.00×10^{-4}	6.32×10^{-5}	2.00×10^{-5}	ρ_1	...	ρ_n
总蛋白 浓度 $\rho_{\text{总}}$	1									
	...									
	n									
n	1									
	...									
	n									
GUS 酶活 y	1	—								
	...									
	n									
标准曲线									—	
x		—								
E_{CTK}		—								

A.3 赤霉素活性检测数据记录见表 A.3。

表 A.3 赤霉素活性检测数据记录表

检测指标		对照组	GA ₃ 标准品工作液 mg/mL					试样溶液 mg/mL		
		细胞系培养液	2.00×10^{-4}	6.32×10^{-5}	2.00×10^{-5}	6.32×10^{-6}	2.00×10^{-6}	ρ_1	...	ρ_n
试验溶液实际浓度		0	1.00×10^{-4}	3.16×10^{-5}	1.00×10^{-5}	3.16×10^{-6}	1.00×10^{-6}	$\rho_1/2$...	$\rho_n/2$
蛋白浓度标准曲线										
OD ₅₉₅	1									
	...									
	n									
总蛋白 浓度 $\rho_{\text{总}}$	1									
	...									
	n									
n	1									
	...									
	n									
GUS 酶活 y	1	—								
	...									
	n									
标准曲线									—	
x		—								
E_{GA}		—								