**国家市场监督管理总局**

**中国国家标准化管理委员会**

### 

GB/T XXXXX—201X

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

植物激素类次生代谢产物的生物活性测定 指示植物法

Detection of the biological activity for plant hormones secondary metabolites——Indicator plant method

（征求意见稿）



发布

发布

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

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：

本标准主要起草人：

**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

本标准规定了植物激素类次生代谢产物的生物活性指示植物法测定的原理、仪器设备及器具、试剂和材料、操作步骤和结果计算。

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。

生长素活性检出限为10-6 E；细胞分裂素活性检出限为10-5 E；赤霉素活性检出限为10-5.5 E。

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，仅所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

下列术语、定义和缩略语适用于本文件。

3.1 术语和定义

3.1.1

植物激素类次生代谢产物 secondary metabolites of plant hormones

来自植物自身合成的以及通过微生物发酵或人工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。

注：单位用E表示。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

3.2.1 NAA：萘乙酸（1-naphthylacetic acid）。

3.2.2 ZT：玉米素（zeatin）。

3.2.3 GA：赤霉酸（gibberellic acid）。

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，通过比较响应单位浓度试样和标准物的特定组织生长量或特定物质合成量，进而得出其生物活性。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T6682二级。

5.2 小麦种子

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

5.3 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≥90%。

5.4 大麦种子

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

5.5 1%（w/v）次氯酸钠溶液

量取100 mL 10%次氯酸钠，用水定容至1000 mL，临用前配制。

5.6 0.1%（w/v）淀粉溶液

称取可溶性淀粉1.00 g，加蒸馏水至50 mL，加热至完全溶解后，再加入磷酸二氢钾 8.16g，待其溶解后定容至1000 mL。临用前配制。

5.7 I2-KI溶液

称取碘化钾0.60 g，碘0.06 g，用0.05 N的盐酸溶解并定容至1000 mL，临用前配制。

5.8 10-8 mol/L乙酸缓冲液

称取三水合乙酸钠136 mg，用水定容至1000 mL，配制成10-3 mol/L的乙酸钠溶液；用移液枪吸取57 µL冰乙酸溶液，用水定容至1000 mL，配制成10-3 mol/L的乙酸溶液。分别量取590 mL 10-3 mol/L的乙酸钠溶液与10-3 mol/L乙酸溶液410 mL，混合后，加入1 g链霉素，摇匀。

5.9 磷酸缓冲液

称取L-酪氨酸0.20 g，用5.5 mL 0.5 N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。将两者混匀后定容至500 mL。4 ℃保存备用或购买同类商品化产品。

5.10 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，用水溶解后定容至1000 mL，充分混匀后，用磷酸氢二钾或柠檬酸调整pH至5.0，4℃保存备用或购买同类商品化产品。

5.11 NAA标准样品：纯度≥99%。

5.12 GA3标准样品：纯度≥99%。

5.13 ZT标准样品：纯度≥99%。

5.14 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。

5.15 1 mg/mL GA3标准贮备液

称取10.0 mg GA3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 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。

5.17 NAA标准工作液

吸取1 mL NAA标准贮备液，用磷酸-柠檬酸缓冲液定容至10 mL，混匀，得到10-1 mg/mL溶液。吸取316 μL NAA标准贮备液，684 μL磷酸-柠檬酸缓冲液，混匀，得到3.16×10-1 mg/mL溶液。依次10倍稀释得到10-4 mg/mL，3.16×10-5 mg/mL，10-5 mg/mL，3.16×10-6 mg/mL，10-6 mg/mL NAA标准工作液。临用前配制。

5.18 GA3标准工作液

吸取1 mL GA3标准贮备液，用磷酸-柠檬酸缓冲液定容至10 mL，混匀，得到10-1 mg/mL溶液。吸取316 μL NAA标准贮备液，684 μL磷酸-柠檬酸缓冲液，混匀，得到3.16×10-1 mg/mL溶液。依次10倍稀释得到10-4 mg/mL，3.16×10-5 mg/mL，10-5 mg/mL，3.16×10-6 mg/mL，10-6 mg/mL GA3标准工作液。临用前配制。

5.19 ZT标准工作液

吸取1 mL ZT标准贮备液，用磷酸-柠檬酸缓冲液定容至10 mL，混匀，得到10-1 mg/mL溶液。吸取316 μL NAA标准贮备液，684 μL磷酸-柠檬酸缓冲液，混匀，得到3.16×10-1 mg/mL溶液。依次10倍稀释得到10-4 mg/mL，3.16×10-5 mg/mL，10-5 mg/mL，3.16×10-6 mg/mL，10-6 mg/mL ZT标准工作液。临用前配制。

6 仪器设备

6.1 带盖托盘：不透光。

6.2 微量移液器。

6.3 容量瓶。

6.4 pH计：精度0.01。

6.5 电子分析天平：精度 0.1 mg，0.01 g，1g。

6.6 生化培养箱：25℃±1℃，遮光处理。

6.7 摇床：25℃±1℃，遮光处理。

6.8 冷冻盒：规格50 mL，16格。

6.9 带图像处理系统的体式显微镜：测量精度1 μm。

6.10 绿光暗室：波长492~455 nm。

6.11 研磨珠子：直径1~2 mm。

6.12 恒温水浴锅：30℃±1℃。

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）的母液，浓度记为c0（mg/mL）。待测时进行10倍梯度稀释。试样至少制备3个浓度梯度。

7.2 生长素测定

7.2.1 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。然后放置在底层铺好两层蒸馏水浸润的滤纸的托盘上排列整齐，覆膜加盖后在无光照的生化培养箱中培养。幼苗生长至约25~35 mm时（约3天），选取长度为25~30 mm的幼苗株，从基部取下芽鞘，在绿光暗室中切去3~5 mm顶端，切取接下来的约6 mm切段，放入盛有磷酸-柠檬酸缓冲液的大培养皿中，置于摇床中摇1.5 h（≤80 r/min），每半小时换一次溶液。

7.2.2 胚芽鞘长度测量

准备冷冻盒，对每格进行编号，将切段一对一放入冷冻盒格子中，置于体式显微镜下测量长度后记录每格中胚芽鞘切段的长度（L0）。一个盒子为一个处理，每格中加入5 mL相应浓度的标准品工作液或试样溶液。以磷酸-柠檬酸缓冲液为对照。生化培养箱培养24 h。然后将处理后的胚芽鞘置于体式显微镜下测量长度并记录（L）。

7.2.3 标准曲线绘制

按表1进行数据测量记录并计算胚芽鞘实际伸长长度ΔL，每一处理组至少需测定15个重复，取重复测试结果绝对差值不超过算术平均值的20%的至少5组数据，计算ΔL的平均值。以10为底取标准品工作液浓度的对数值x为自变量，以处理组和对照组中胚芽鞘切断的平均伸长长度比值（ΔLn/ΔL0）为因变量y，绘制标准曲线。

表1 标准曲线制作相关试验处理设置及数据记录表

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组号（Pn） | 对照组 | 处理组 | | | | |
| P0 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 |
| 原胚芽鞘切段长度L0（μm） | L00 | L01 | L02 | L03 | L04 | L05 |
| 标准工作液浓度（mg/mL） | 0 | 10-6 | 3.16×10-6 | 10-5 | 3.16×10-5 | 10-4 |
| 标准工作液浓度的对数值x | —— | -6 | -5.5 | -5 | -4.5 | -4 |
| 处理后胚芽鞘切段长L（μm） | L0 | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 |
| 处理后胚芽鞘实际伸长长度ΔL（μm） | ΔL0=  L0- L00 | ΔL1=  L1- L01 | ΔL2=  L2- L02 | ΔL3=  L3- L03 | ΔL4=  L4- L04 | ΔL5=  L5- L05 |

7.2.4 测量

测量试样溶液处理的胚芽鞘切段长度后计算实际伸长长度ΔL，每一组至少需测定15个重复，取重复测试结果绝对差值不超过算术平均值的20%的至少5组数据，计算ΔL的平均值。获得试样组和对照组中胚芽鞘切断的平均伸长长度比值y（ΔLn/ΔL0），试验得到的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，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（1）式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（1）式计算后取其平均值。

7.3 细胞分裂素测定

7.3.1 试验用尾穗苋幼苗的获取

将足量（2 g左右）尾穗苋种子用现配的2%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℃生化培养箱吸胀5 h，然后放于盛有消毒后的定性滤纸的18 cm大培养皿中，加入9 mL蒸馏水，覆膜加盖，25℃黑暗培养72 h发芽。选取子叶大小均一的黄化幼苗。

7.3.2 苋红素浓度测量

分别挑选长势均匀的黄化苗30株移入垫有两层滤纸的6 cm培养皿中，每个培养皿为一个处理，分别加入1 mL不同浓度的标准工作液或试样溶液，以磷酸缓冲液作为对照，于黑暗条件下，在培养箱中继续培养48 h，用镊子选取大小、颜色相对均一的子叶40个并将其转入盛有1 mL蒸馏水的离心管中，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，10000 rpm离心5 min后，取0.8 mL红色上清液加入事先加好4.2 mL蒸馏水的离心管，以对照管调零，用紫外分光光度计在波长为534 nm和650 nm处分别读取光密度值OD534和OD650，记录相减的差数（OD534–OD650），即指示苋红素浓度的光密度值D。

7.3.3 标准曲线绘制

按表2进行数据测量记录并计算光密度值D（OD534–OD650）。以10为底取标准品工作液浓度的对数值x为自变量，以处理组中光密度值Dn为因变量y，绘制标准曲线。

表2 标准曲线制作相关试验处理设置及数据记录表

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组号（Pn） | P1 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 |
| 标准工作液浓度（mg/mL） | 0 | 10-5 | 3.16×10-5 | 10-4 | 3.16×10-4 | 10-3 |
| 标准工作液浓度的对数值X | 对照 | -5 | -4.5 | -4 | -3.5 | -3 |
| OD534 | —— | OD5341 | OD5342 | OD5343 | OD5344 | OD5345 |
| OD650 | —— | OD6501 | OD6502 | OD6503 | OD6504 | OD6505 |
| 光密度差值  D= OD534 - OD650 | —— | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 |

7.3.4 测量

测量并计算试样溶液处理后苋红素浓度的光密度值D，D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，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（1）式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（1）式计算后取其平均值。

7.4 赤霉素测定

7.4.1试验用无胚大麦半粒种子的获取

将约200粒大麦种子用手术刀片横切两半，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，重复一次。然后放于盛有湿润消毒滤纸的大培养皿中吸胀48 h，取出放进50 mL离心管中，以50~100 r/min揺1.5 h，每0.5 h换一次水，于滤纸上轻轻吸干后，备用。

7.4.2 α-淀粉酶活性测量

分别在10 mL离心管中放入已吸胀的10个大麦无胚半粒种子，每个离心管为一个处理，分别加入1 mL不同浓度的标准品溶液或待测样品，以乙酸缓冲液为对照。将试管放进摇床中60~100 rpm震荡培养24 h。用研棒将种子研碎混匀后低速离心，使种子碎屑沉淀，然后从每个离心管中吸取上清液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℃水浴10 min。再加入I2-KI溶液2 mL，蒸馏水定容至5 mL，充分摇匀（溶液呈蓝色），以对照管调零，用紫外分光光度计读取每管中溶液的OD580值，指示α-淀粉酶活性。

7.4.3 标准曲线绘制

按表3进行数据测量记录并计算光密度值D（OD580）。以10为底取标准品工作液浓度的对数值x为自变量，以处理组的光密度值Dn为因变量y，绘制标准曲线。

表3 标准曲线制作相关试验处理设置及数据记录表

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组号（Pn） | P1 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |
| 标准工作液浓度（mg/mL） | 0 | 3.16×10-6 | 10-5 | 3.16×10-5 | 10-4 | 3.16×10-4 | 10-3 |
| 标准工作液浓度的对数值X | 对照 | -5.5 | -5 | -4.5 | -4 | -3.5 | -3 |
| 活性测定后分光光度值D（OD580） | —— | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 |

7.4.4 测量

测量并计算试样溶液处理后的光密度值D，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，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（1）式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（1）式计算后取其平均值。

8 结果计算

试样中含有的生长素活性按式（1）计算：

式中：

*E*——激素的生物活性；

*c*——有效试验试样浓度（mg/mL）；

*x*——标准工作液浓度的对数值；

*c0*——试样配制母液的浓度（mg/mL）。

以三次实验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。