**国家市场监督管理总局**

**中国国家标准化管理委员会**

发布

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 细胞学评价法

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

（征求意见稿）



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 细胞学评价法**

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细胞学评价法测定的原理、试剂或材料、仪器设备、测定步骤和结果分析。

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。

SN/T 3926 出口乳、蛋、豆类食品中蛋白质含量的测定 考马斯亮蓝法。

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）。

3.2.4 GUS：β-葡糖糖苷酸酶（β-glucuronidase）。

3.2.5 4-MUG：4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷（4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide）。

3.2.6 4-MU：4-甲基伞形酮（4-methylumbelliferon）。

4 原理

植物激素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。基于响应植物激素的细胞模型，通过比较响应单位浓度试样和标准物的GUS蛋白表达水平来评价激素的生物活性。

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 AuxREs-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≥106/mL。

5.3 TATC-box-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≥106/mL。

5.4 ARR1AT-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≥106/mL。

5.5 细胞系培养液

不含蔗糖和琼脂的MS培养基4.74 g，加水溶解后，加入30 g蔗糖、0.75 g CaCl2，0.35g KNO3，定容至1000 mL，充分混匀后用NaOH调整pH至5.60，0.22 μm滤膜过滤除菌。现配现用。

5.6 PBS溶液

称取NaCl 8 g，KCl 0.2 g，Na2HPO4•12H2O 3.63 g，KH2PO4 0.24 g，溶于900 mL水中，用盐酸调pH值至7.4， 加水定容至1 L，混匀后常温保存备用。

5.7 抽提液

称取Na2-EDTA•2H2O 3.72 g，加入β-巯基乙醇700 μL, Triton-X 100 1 mL，用PBS溶液溶解并定容至1000 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

用PBS将牛血清蛋白标准品稀释至终浓度为0.2 mg/mL。

5.10 反应终止液

称取21.2 g Na2CO3，用水溶解并定容至1000 mL。

5.11 考马斯亮蓝G-250

称取500 mg考马斯亮蓝G-250，溶于50 mL 90%的乙醇中，并加入85%的磷酸100 mL，用水定容至1000 mL，混匀后常温保存。有效期一个月。

5.12 10 μmmol/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，然后吸取1 mL加入9 mL反应终止液，混匀后吸取100 μL加入9.9 mL反应终止液混匀，4℃避光暂存。

5.13 4-MU使用液

吸取200 μL 10 μmol/L 4-MU母液，用反应终止液定容至10 mL，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标准样品：纯度≥99%。

5.15 GA3标准样品：纯度≥99%。

5.16 ZT标准样品：纯度≥99%。

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 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。

5.19 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。

5.21 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。

5.22 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 pH计：精度0.01。

6.2 电子分析天平：精度 0.1 mg，0.01 g，1g。

6.3 光照培养箱：25℃±1℃，光照强度5000 lux。

6.4 恒温水浴锅：37℃。

6.5 细胞培养板： 12格。

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）。待测时用细胞系培养液将母液进行10倍梯度稀释。试样至少制备3个浓度梯度。

7.2 GUS蛋白诱导表达水平测定

准备细胞培养板，对每格进行编号，按检测对象选择相应的细胞系和标准物，每格中加入1 mL细胞系以及1 mL相应浓度的标准品工作液或试样溶液，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℃ 14000 g离心30 min后吸取上清液即为样品溶液。

分别吸取0，2.0，4.0，6.0，8.0，12，16，20 μL标准品牛血清蛋白溶液加入到酶标板加样孔中，加PBS溶液补足至20 μL（各孔中牛血清蛋白含量分别为0，0.40，0.80，0.12，0.16，2.40，3.20，4.00 μg）；根据样品中蛋白含量吸取适量样品（体积为v）加入到酶标板加样孔中，加PBS溶液补足至20 μL；每个标准品或样品溶液重复加入3个加样孔，以PBS溶液为空白对照调零，然后分别加入200 μL G-250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（1）式计算样品中总蛋白浓度c总。

式中：

*C总*——样品中总蛋白浓度，单位为μg/μL；

*x*——从标准曲线得到的样品中蛋白质含量，单位为μg；

*v*——加样的体积，单位为μL。

计算结果保留三位有效数字。

取适量样品溶液（使总蛋白在100 μg左右），记录体积V，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加入到酶标板加样孔。吸取200 μL 4-MU标准品使用液（4-MU标准品含量分别为40 pmol、20 pmol、10pmol、5 pmol、2.5 pmol、1.25 pmol），加入到酶标板加样孔。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。以样品反应时间为横坐标，荧光强度为纵坐标绘制标准曲线得到斜率a1，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，得到斜率a2，并根据（2）式计算样品中GUS蛋白表达水平y。

式中：

*y*——样品中GUS蛋白表达水平，单位为pmol 4-MU/μg 总蛋白/min

*a1*——样品中GUS蛋白催化4-MUG后每分钟产生的荧光强度变化，单位为Fl/min；

*a2*——1 pmol/L的4-MU标准品产生的荧光强度，单位为Fl/pmol4-MU；

*C总*——样品中总蛋白浓度，单位为μg/μL。

*V*——加样体积，单位为μL。

计算结果保留三位有效数字。

7.3 标准曲线绘制

按7.2方法测定标准品工作液处理后的GUS蛋白表达水平y。以10为底取标准品工作液浓度的对数值x为自变量，GUS蛋白表达水平y为因变量，绘制标准曲线。

7.4 测量

测量并计算试样溶液处理后GUS蛋白的表达水平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，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（3）式计算试样中植物激素的生物活性，若有多个有效y值，则按（3）式计算后取其平均值。

8 结果计算

试样中含有的植物激素活性按式（3）计算：

式中：

*E*——植物激素的生物活性；

*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。

9 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对值差值不得超过算数平均值的20%。