

细胞壁不溶性酸性转化酶 (B-AI) 试剂盒说明书

(货号: G0518F 分光法 24 样)

一、产品简介:

蔗糖酶即蔗糖转化酶 (Invertase, E.C.3.2.1.26) 在蔗糖代谢中催化蔗糖分解为果糖和葡萄糖, 是高等植物蔗糖代谢关键酶之一。根据最适 PH 值, 蔗糖转化酶分为酸性转化酶 (AI) 和中性转化酶 (NI) 两种类型, 许多报道均将中性转化酶同碱性转化酶看作一种转化酶。

AI 的最适 pH 为 3.0~5.0, AI 分为可溶性 AI(S-AI)和细胞壁不溶性 AI (B-AI: cell-wall binding acid invertase) 两种类型, 前者分布在液泡中或细胞自由空间, 后者存在于细胞间隙并结合在细胞壁上。B-AI 主要参与韧皮部质外体卸载时蔗糖的分解, 以维持库源之间蔗糖的浓度。

B-AI 催化蔗糖降解产生还原糖, 进一步与 3,5-二硝基水杨酸反应, 生成棕红色氨基化合物, 经光谱扫描在 540nm 有特征光吸收, 在一定范围内 540nm 光吸收增加速率与 B-AI 活性成正比。

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 A	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
提取液 B	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃ 保存	临用前加入 7.5mL 试剂一充分溶解备用; 用不完的试剂 4℃ 保存;
试剂三	液体 13mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、水浴锅、移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、细胞壁不溶性酸性转化酶 (B-AI) 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:

- ① 按照组织质量 (g): 提取液 A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 A), 进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃ 离心 10min, 弃上清, 留沉淀。
- ② 沉淀中加入 1mL 蒸馏水, 震荡混匀, 12000rpm 4℃ 离心 10min, 弃上清, 留沉淀。
- ③ 沉淀中加入 1mL 提取液 B 充分混匀, 4℃ 浸提过夜, 12000 rpm 4℃ 离心 20min, 取上清置冰上待测。

2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。
- ② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	250	500
试剂二	250	
混匀, 37℃ 准确水浴 20min 后, 95℃ 水浴 10min (用封口膜缠紧, 以防止水分散失), 流水冷却后充分混匀 (以保证浓度不变)		
试剂三	250	250

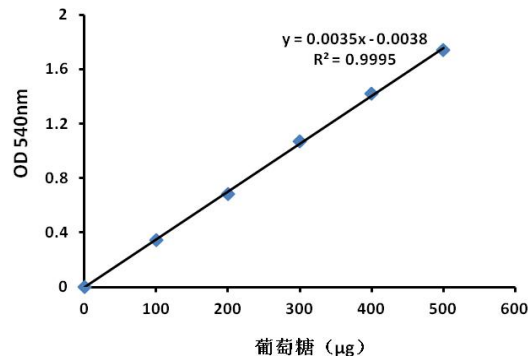
混匀，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中，540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 对照（每个测定管需设一个对照管）。

【注】：1.若吸光值大于 1.5，可以用蒸馏水稀释样本后测定，计算公式中乘以相应稀释倍数 D。

2.若 ΔA 值在零附近徘徊，可增加样本加样体积 V1（如增至 200 μ L，则试剂一相应减少），或延长 37℃水浴时间（如增至 40min 或更长），则相应的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 0.0035x - 0.0038$ ；x 为标准品质量（ μ g），y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

单位定义：37℃每毫克蛋白每分钟产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{细胞壁不溶性酸性转化酶(B-AI)}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0038) \div 0.0035] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 142.9 \times (\Delta A + 0.0038) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

3、按鲜重计算：

单位定义：37℃每克组织每分钟产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{细胞壁不溶性酸性转化酶(B-AI)}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0038) \div 0.0035] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 142.9 \times (\Delta A + 0.0038) \div W \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.1mL；

T---反应时间，20min；

W---样本鲜重，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

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；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（5mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 1, 2, 3, 4, 5. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照：100 μ L 标准品+500 μ L 试剂一+250 μ L 试剂三，依次加样操作，95℃水浴 10min，冷却后，全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中，540nm 下测定，根据结果即可制作标准曲线。