

细胞壁不溶性酸性转化酶 (B-AI) 试剂盒说明书

(货号:

BP10278F 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液 A	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
提取液 B	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 7.5mL 试剂一充分溶解备用; 3. 用不完的试剂 4℃ 保存;
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
标准品	粉体 1 支	4℃ 保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- 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、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。
- ② 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
-----------	-----	-----

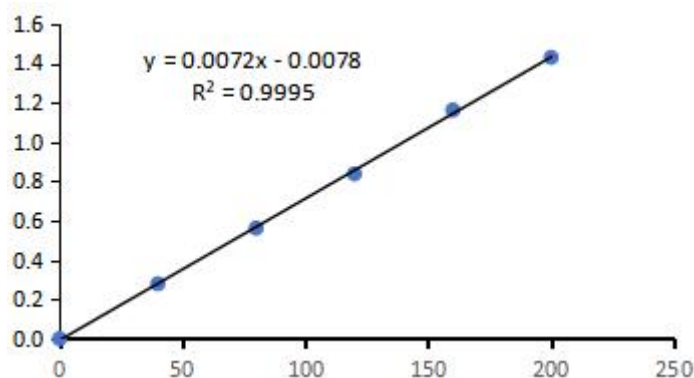
样本	40	40
试剂一	100	200
试剂二	100	
混匀，37℃准确水浴 20min 后，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀（以保证浓度不变）		
试剂三	100	100
混匀，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，吸取 200μL 转移至 96 孔板中，540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-A 对照（每个测定管需设一个对照管）。		

【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 80μL，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 $y = 0.0072x - 0.0078$ ；x 为标准品质量（μg），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 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{细胞壁不溶性酸性转化酶(B-AI)}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0078) \div 0.0072] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D \\ = 173.6 \times (\Delta A + 0.0078) \div Cpr \times D$$

3、按鲜重计算：

单位定义：37℃每克组织每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{细胞壁不溶性酸性转化酶(B-AI)}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0078) \div 0.0072] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 173.6 \times (\Delta A + 0.0078) \div W \times D$$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入反应体系中样本体积，0.04mL；

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：

- 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)，标准品母液浓度为 5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 1, 2, 3, 4, 5. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 标品稀释参照表如下：

标品浓度 mg/m	0	1	2	3	4	5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	40	
蒸馏水		40
试剂一	200	200
试剂三	100	100
95°C水浴 10min，冷却后，取 200μL 至 96 孔板中，540nm 下测定， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		