

细胞壁不溶性酸性转化酶（B-AI）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-ZT010 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、细胞壁不溶性酸性转化酶（B-AI）活性测定：

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：

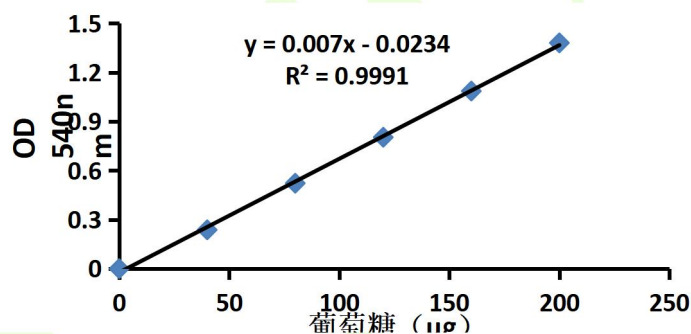
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	100	200
试剂二	100	
混匀, 37℃准确水浴 20min 后, 95℃水浴 10min (用封口膜缠紧, 以防止水分散失), 流水冷却后充分混匀 (以保证浓度不变)		
试剂三	100	100
混匀, 95℃水浴 10min (用封口膜缠紧, 以防止水分散失), 流水冷却后充分混匀, 吸取 200μL 转移至 96 孔板中, 540nm 处读取吸光值 A, ΔA=A 测定-A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。		

【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 $y = 0.007x - 0.0234$; 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。

$$\begin{aligned} \text{细胞壁不溶性酸性转化酶(B-AI)}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0234) \div 0.007] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 178.6 \times (\Delta A + 0.0234) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

3、按鲜重计算:

单位定义: 37℃每克组织每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{细胞壁不溶性酸性转化酶(B-AI)}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0234) \div 0.007] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 178.6 \times (\Delta A + 0.0234) \div W \times D \end{aligned}$$

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

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:

- 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：40 μ L 标准品+200 μ L 试剂一+100 μ L 试剂三，依次加样操作，95 $^{\circ}$ C水浴 10min，冷却后，取 200 μ L 至 96 孔板中，540nm 下测定，根据结果即可制作标准曲线。

