

细胞壁不溶性酸性转化酶（B-AI）试剂盒说明书

（货号：ADS-F-ZT010 分光法 24 样 有效期：6 个月）

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℃ 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 13mL×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、所需的仪器和用品：

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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

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

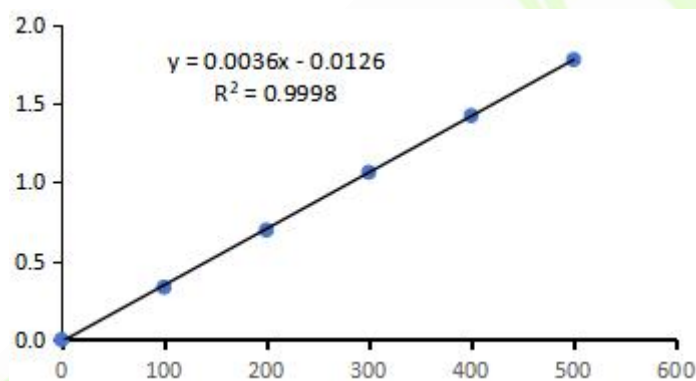
试剂一	250	500
试剂二	250	
混匀，37℃准确水浴 20min 后，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀（以保证浓度不变）		
试剂三	250	250
混匀，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中，540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管需设一个对照管）。		

【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 μL ，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 $y = 0.0036x - 0.0126$ ；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 1 μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{细胞壁不溶性酸性转化酶(B-AI)}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0126) \div 0.0036] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 138.9 \times (\Delta A + 0.0126) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

3、按鲜重计算：

单位定义：37℃每克组织每分钟产生 1 μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{细胞壁不溶性酸性转化酶(B-AI)}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0126) \div 0.0036] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 138.9 \times (\Delta A + 0.0126) \div W \times D \end{aligned}$$

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 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。
- 2 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	100	
蒸馏水		100
试剂一	500	500
试剂三	250	250
95°C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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - 0 \text{ 浓度管}$ 。		