



细胞壁不溶性酸性转化酶活性检测试剂盒

B-AI Assay Kit

微量法

产品编号: AK434M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES434-1	100mL×1 瓶	4℃保存;
ES434-2	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK434-A	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK434-B	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入10mL试AK434-A充分溶解备用; 剩余试剂4℃保存;
AK434-C	15mL×1 瓶	4℃保存;
AK434-标准品	粉剂×1 支	用时加入 1 mL 蒸馏水充分溶解, 制备 10 mg/mL 葡萄糖标准溶液待用; 用不完的试剂 4℃保存一周。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 蔗糖转化酶 (Invertase, Ivr) 催化蔗糖不可逆地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, 将高等植物蔗糖转化酶分为酸性转化酶 (Acid invertase, AI) 和中性转化酶 (Neutral invertase, NI) 两种类型。

酸性转化酶 (AI) 的最适 pH 为 3~5。AI 分为可溶性酸性转化酶 (S-AI) 和细胞壁不溶性酸性转化酶 (B-AI) 两种类型。B-AI 存在于细胞间隙并结合在细胞壁上, 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。

原理: 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, 在 520nm 有特征光吸收, 在一定范围内 520nm 光吸收增加速率与 B-AI 活性成正比。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取:

按照组织质量 (g): ES434-1 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES434-1), 进行冰浴匀浆。12000g 4℃离心 10min, 弃上清, 沉淀中加入 1mL 蒸馏水, 充分震荡混匀, 12000g 4℃离心 10min, 弃上清, 沉淀中加入 1mL ES434-2 充分混匀, 4℃浸提过夜, 12000g 4℃离心 20min, 取上清置冰上待测。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 520nm, 蒸馏水调零。
2. 标准品的制备: 将标准品用蒸馏水稀释至 2、1.5、1.2、1、0.8、0.5、0mg/mL (0mg/mL 为空白管)。
3. 样本测定, (在 EP 管中依次加入下列试剂):

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
样本	50	50		
标准溶液			50	
蒸馏水	200			
AK434-A	200	200	200	200
AK434-B		200	200	200
混匀, 37℃准确水浴 30min				

AK434-C	125	125		125
混匀，95℃水浴 10min（盖紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，取 200 μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中，520nm 处记录各管吸光值 A，如果吸光值大于 2，可以用蒸馏水稀释后测定（计算公式中乘以相应稀释倍数），分别记为 A 对照管，A 测定管，A 标准管，A 空白管。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。每个测定管需设一个对照管（标准曲线只需检测 1-2 次）。每个测定管需要设一个对照管。				

B-AI 活性计算：

1. 标准曲线的建立：以各浓度下吸光值减空白管（浓度为 0mg/mL）的吸光度为 y 轴，葡萄糖浓度为 x 轴绘制标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA 带入方程得到 x（mg/mL）。

2. B-AI 活性计算：

（1）按照蛋白浓度计算

单位的定义：37℃每 mg 蛋白每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{B-AI 活性 } (\mu\text{g/min /mg prot}) = [1000 \times x \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 33.33x \div \text{Cpr}$$

（2）按样本鲜重计算

单位的定义：37℃每 g 组织每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{B-AI 活性 } (\mu\text{g/min /g 鲜重}) = [1000 \times x \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T = 33.33x \div W$$

注：1000: 1mg/mL=1000 μg/mL；V1: 加入反应体系中样本体积，0.05mL；V2: 加入提取液体积，1mL；

T: 反应时间，30min；Cpr: 样本蛋白质浓度，mg/mL；W: 样本鲜重，g。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))