

可溶性酸性转化酶 (Soluble acid invertase, S-AI) 试剂盒说明书

(货号: BN72327 微板法 96 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) 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。

S-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 S-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	液体 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×2 瓶	4°C保存	使用前甩几下使粉体落入底部, 每瓶再加入 7.5mL 试剂一充分溶解备用; 用不完的试剂 4°C保存。
试剂三	液体 22mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、可溶性酸性转化酶 (S-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:

称样本 0.1g (水分充足的样本可取 0.5g) 于研钵中, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆后转入离心管中。12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注意】 若样本含糖量高, 可引起 A 对照值较大如超过 1.6, 即检测背景值过高会影响检测, 可在样本制备过程中增加除糖步骤: 取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆, 4°C放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 5min; 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入经预冷的 80%乙醇混匀, 4°C放置 5min; 12000rpm, 4°C离心 5min; 弃上清, 留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液涡旋混匀, 4°C放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 10min; 留上清, 弃沉淀。上清液置冰上待测。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。
- ② 试剂一和二可于 37°C条件下孵育 15min 左右, 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	100	200
试剂二	100	
混匀, 37°C准确水浴 20min 后, 95°C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

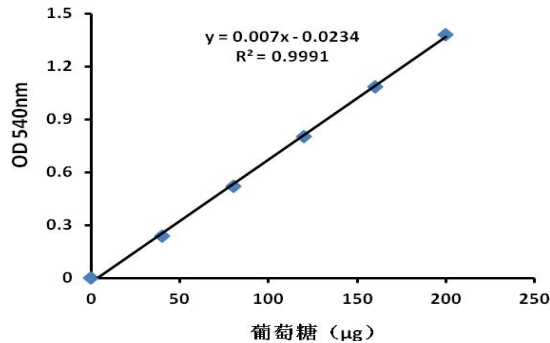
本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

混匀, 95°C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)。

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°C每毫克蛋白每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

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

3、按鲜重计算:

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

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

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°C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: 40μL 标准品+200μL 试剂一+100μL 试剂三, 依次加样操作, 95°C水浴 10min, 冷却后, 取 200μL 至 96 孔板中, 540nm 下测定, 根据结果即可制作标准曲线。