

Cell Wall Insoluble Acid Invertase Kit

细胞壁不溶性酸性转化酶（B-AI）试剂盒说明书

货号: BN72594 | 方法: 微板法 | 规格: 48 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: 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 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℃ 保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃ 保存	用前加入 7.5mL 试剂一充分溶解备用; 用不完的试剂 4℃ 保存;
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 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、移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、细胞壁不溶性酸性转化酶（B-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:

- 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 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℃ 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)		

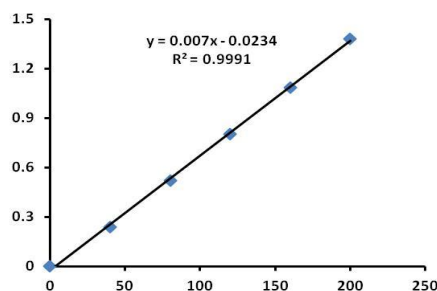
试剂三	100	100
混匀，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，吸取 200μL 转移至 96 孔板中，540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管需设一个对照管）。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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；