

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0509

Size: 100T/48S

可溶性酸性转化酶 (S-AI) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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 Ivr 分为酸性转化酶(AI)和中性转化酶(NI)两种类型。

二、测定原理:

S-AI 催化蔗糖分解产生还原糖, 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 540nm 有特征光吸收, 在一定范围内 540nm 光吸收值与还原糖生成量成正比。通过光吸收增加速率来计算 S-AI 活性。

三、需自备的仪器和用品:

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

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存	临用前加入 20mL 试剂一充分溶解备用;
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂×1 支	4°C保存	10mg 无水葡萄糖; 临用前加入 1mL 蒸馏水

			溶解, 制备 10mg/mL 葡萄糖标准液备用。
--	--	--	--------------------------

五、粗酶液提取:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆; 12000g, 4°C, 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

六、标准曲线绘制

将标准液用蒸馏水稀释为 2、1.5、1.0、0.5、0.25 mg/mL 葡萄糖标准液, 按照测定步骤分别测定 2、1.5、1.0、0.5、0.25、0 mg/mL 葡萄糖标准液在 540nm 下的吸光度 (A), 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。

七、测定步骤和加样表:

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。
- 2、样本测定, (在 1.5mL EP 管中依次加入下列试剂)

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管
粗酶液	50	50	-
试剂一		200	-
试剂二	200		200
标准液	-	-	50
混匀, 37°C准确水浴 30min 后, 煮沸 10min 左右 (盖紧, 以防止水分散失), 流水冷却后充分混匀 (以保证浓度不变), 12000 g, 4°C离心 5min, 取上清 (考虑有部分沉淀, 一般取 200ul)。			
试剂三	125	125	125

混匀, 煮沸 10min 左右 (盖紧, 以防止水分散失) 流水冷却后充分混匀, 取 200 μL 至微量玻璃比色皿或 96 孔板中, 540nm 处记录各管吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

八、注意事项：

- 1、如果加入试剂三，煮沸 10min 后有混浊物出现，建议离心除去沉淀后，取上清测定吸光度；
- 2、如果吸光值大于 1，可以用蒸馏水将样本稀释后测定（计算公式中乘以相应稀释倍数）

九、S-AI 活性计算：

标准条件下测定的回归方程为 $y=kx+b$ ； x 为标准品浓度（mg/mL）， y 为吸光值。

1、按蛋白浓度计算

单位定义：37°C 每 mg 蛋白每分钟产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{S-AI 活性 (U/mg prot)} = (x \times V1 \times 1000) \div (V1 \times Cpr) \div T = 33.3 \times x \div Cpr$$

2、按鲜重计算

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

$$\text{S-AI 活性 (U/g)} = (x \times V1 \times 1000) \div (W \times V1 \div V2) \div T = 33.3 \times x \div W$$

1000: 1 mg/mL = 1000 μ g/mL ; V1: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL; V2: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本鲜重, g; T: 反应时间: 30min。