

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-S0512

Size: 100T/48S

细胞壁不溶性化酶 (B-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, Ivr 分为酸性转化酶 (AI) 和中性转化酶 (NI) 两种类型。AI 的最适 pH 为 3~5。AI 分为可溶性 AI (S-AI) 和细胞壁不溶性 AI (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。

二、测定原理:

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 510nm 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。

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、微量石英比色皿/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
提取液一	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 45mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 20mL 试剂一充分溶解备用; 用不完的试剂 4℃保存;
试剂三	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	

标准品	粉剂×1 瓶 (10 mg 无水葡萄糖)	4℃保存	临用前加入 1mL 蒸馏水溶解，配成 10mg/mL 葡萄糖溶液备用，4℃保存一周。
-----	----------------------	------	--

五、粗酶液提取：

按照组织质量 (g) : 提取液 1 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 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 提取液 2 充分混匀，4℃浸提过夜，12000g 4℃离心 20min，取上清置冰上待测。

六、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. 将 10mg/mL 标准液用蒸馏水稀释为 2、1、0.8、0.6、0.5、0.4、0.3mg/mL 的标准溶液备用。
3. 操作表：(在 1.5 mL 离心管中操作)

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	标准管	空白管
样本	80	80	-	-
标准溶液	-	-	80	-
蒸馏水	-	-	-	80
试剂一	320	-	320	320
试剂二	-	320	-	-
混匀，37℃水浴 30min 后，95℃水浴 10 min (盖紧，防止水分散失)				
试剂三	200	200	200	200
混匀，95℃水浴 5 min (盖紧，防止水分散失)，冷却至室温。				
混匀，取 200μL 置于微量玻璃比色皿/96 孔板中，测定 540nm 处吸光值 A，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，标准曲线只需检测一次。				

注意：如果样本在 37°C 反应后的 95°C 水浴步骤中出现沉淀，建议室温 12000g，离心 5 min，取上清（若上清不足 400 μL，可按比例缩小加样体系，如 300 μL 上清+150 μL 试剂三）进行下一步操作。

七、B-AI 活性计算：

1、标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 带入方程得到 x (mg/mL)

2、B-AI 活性的计算：

(1) 按蛋白浓度计算

酶活定义：37°C 每 mg 蛋白每分钟分解蔗糖产生 1μg 还原糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{B-AI 酶活 (U / mg prot)} = x \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times C_{\text{pr}}) \times 10^3 \div T = 33.33x \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

酶活定义：37°C 每 g 样品每分钟分解蔗糖产生 1 μg 还原糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{B-AI 酶活 (U / g 鲜重)} = x \times V_{\text{提取}} \times 10^3 \div W \div T = 33.33x \div W$$

V 提取：提取液体积，1 mL； 10^3 ：单位换算系数，1mg = 10^3 μg；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本质量，g；T：反应时间，30 min。

八、注意事项：

1. 当 A 或 ΔA 超过 1.5 时，建议将样本用提取液二稀释后再进行测定，计算公式中乘以稀释倍数。
2. 95°C 水浴时 EP 管盖紧，防止水分散失，待冷却至室温后，再进行下一步操作，避免液体飞溅烫伤以及影响试验数据。