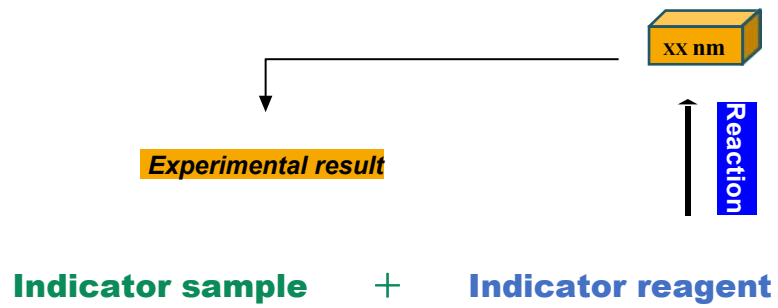


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 细胞壁不溶性化酶（B-AI） 试剂盒说明书

### 微量法

**注意：**正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

**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。

**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。

**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。

**试剂的组成和配制：**

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 1 mL 蒸馏水溶解，配成 10 mg/mL葡萄糖溶液备用，4℃保存一周。

**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，12000g4℃离心20min，取上清置冰上待测。

**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 10 mg/mL 标准液用蒸馏水稀释为 2、1、0.8、0.6、0.5、0.4、0.3 mg/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°C水浴 30min 后, 95°C水浴 10 min (盖紧, 防止水分散失)				
试剂三	200	200	200	200
混匀, 95°C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。

**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  $\Delta A$  标准为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程  $y=kx+b$ , 将  $\Delta A$  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 1 μg 还原糖为 1 个酶活力单位。

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

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 =  $10^3\mu\text{g}$ ; Cpr: 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。

**注意事项:**

- 1 当 A 或  $\Delta A$  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。