

细胞壁不溶性酸性转化酶 (cell-wall binding acid invertase, B-AI)

试剂盒说明书

微量法 100管/48样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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，主要参与初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510nm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。

试剂组成和配制：

提取液1：液体100mL×1瓶，4℃保存；

提取液2：液体100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体20mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1瓶，4℃保存；临用前加入10mL试剂一充分溶解备用；用不完的试剂4℃保存；

试剂三：液体15mL×1瓶，4℃保存；

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。

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510nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定，（在EP管中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一		200

试剂二	200	
-----	-----	--

混匀，37°C准确水浴30min后，95°C水浴10min（盖紧，以防水分散失），流水冷却后充分混匀（以保证浓度不变）

试剂三	125	125
-----	-----	-----

混匀，95°C水浴10min（盖紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，取200 μ L至微量石英比色皿或96孔板中，510nm处记录各管吸光值A，如果吸光值大于2，可以用蒸馏水稀释后测定(计算公式中乘以相应稀释倍数)， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管设一个对照管。

B-AI活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.0016x - 0.001$ ；x为标准品浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ），y为吸光值。

(1) 按蛋白浓度计算：

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

$$\text{B-AI活性 } (\mu\text{g/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.001) \div 0.0016 \times V_1] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 20.8 \times (\Delta A + 0.001) \div \text{Cpr}$$

(2) 按鲜重计算：

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

$$\text{B-AI活性 } (\mu\text{g/min/g鲜重}) = [(\Delta A + 0.001) \div 0.0016 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) \div T = 20.8 \times (\Delta A + 0.001) \div W$$

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

b.用96孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.0008x - 0.001$ ；x为标准品浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ），y为吸光值。

(1) 按蛋白浓度计算：

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

$$\text{B-AI活性 } (\mu\text{g/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.001) \div 0.0008 \times V_1] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 41.6 \times (\Delta A + 0.001) \div \text{Cpr}$$

(2) 按鲜重计算：

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

$$\text{B-AI活性 } (\mu\text{g/min/g鲜重}) = [(\Delta A + 0.001) \div 0.0008 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) \div T = 41.6 \times (\Delta A + 0.001) \div W$$

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