

使用说明书

Instruction Manual

细胞壁不溶性酸性转化酶活性检测试剂盒（分光光度法）

B-AI Assay Kit (Spectrophotometry)

产品描述

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，将高等植物蔗糖转化酶分为酸性转化酶（Acid invertase, AI）和中性转化酶（Neutral invertase, NI）两种类型。酸性转化酶（AI）的最适 pH 为 3-5。AI 分为可溶性酸性转化酶（S-AI）和细胞壁不溶性酸性转化酶（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。

检测原理

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 520nm 有特征光吸收，在一定范围内 520nm 光吸收增加速率与 B-AI 活性成正比。

产品组成及储存条件

50T/24S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0033S-ES-1	50mL×1 瓶	4℃保存。
CB0033S-ES-2	50mL×1 瓶	4℃保存。
CB0033S-A	50mL×1 瓶	4℃保存。
CB0033S-B	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 25mL 试 CB0033S-A 充分溶解备用； 剩余试剂 4℃保存。
CB0033S-C	30mL×1 瓶	4℃保存。
CB0033S-Standard	粉剂×1 支	用时加入 1 mL 蒸馏水充分溶解，制备 10 mg/mL 葡萄糖 标准溶液待用；用不完的试剂 4℃保存一周。

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

二、粗酶液提取：

按照组织质量（g）：CB0033S-ES-1 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0033S-ES-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 CB0033S-ES-2 充分混匀，4℃浸提过夜，12000g 4℃离心 20min，取上清置冰上待测。

三、测定步骤：

- 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 520nm，蒸馏水调零。
- 标准品的制备：将标准品用蒸馏水稀释至 2、1.5、1.2、1、0.8、0.5、0mg/mL（0mg/mL 为空白管）。
- 样本测定（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
样本	200	200		
标准溶液			200	
蒸馏水	800			200
CB0033S-A	800	800	800	800
CB0033S-B		800	800	800
混匀，37℃准确水浴 30min。				
CB0033S-C	500	500	500	500

混匀，95℃水浴 10min（盖紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，520nm 处，蒸馏水调零，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），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 1-2 次）。每个测定管需要设一个对照管。

四、B-AI 活性计算：

1. 标准曲线的建立：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。根据标准曲线，将 ΔA 带入方程得到 x（mg/mL）。

2. B-AI 活性计算：

（1）按照蛋白浓度计算

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

B-AI 活性 (μg/min /mg prot) = $[1000 \times x \times V1] \div (V1 \times Cpr) \div T = 33.33x \div Cpr$

（2）按样本鲜重计算

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

B-AI 活性 (μg/min /g 鲜重) = $[1000 \times x \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T = 33.33x \div W$

注：1000：1mg/mL=1000μg/mL；V1：加入反应体系中样本体积，0.2mL；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。

注意事项

1. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

