细胞壁不溶性酸性转化酶（B-AI）试剂盒说明书

（分光法 24 样）

一、产品简介：

蔗糖酶即蔗糖转化酶（Invertase，E.C.3.2.1.26）在蔗糖代谢中催化蔗糖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 值，蔗糖转化酶分为酸性转化酶（AI）和中性转化酶（NI）两种类型，许多报道均将中性转化酶同碱性转化酶看作一种转化酶。

AI 的最适 pH 为 3.0～5.0，AI 分为可溶性 AI(S-AI)和细胞壁不溶性 AI（B-AI：cell-wall binding acid invertase）两种类型，前者分布在液泡中或细胞自由空间，后者存在于细胞间隙并结合在细胞壁上。B-AI 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。

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，经光谱扫描在 540nm 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。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液 A	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
提取液 B	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 7.5mL 试剂一充分溶解备用；用不完的试剂 4℃保存;
试剂三	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、水浴锅、移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、细胞壁不溶性酸性转化酶（B-AI）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 按照组织质量（g）：提取液 A 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 A），进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 10min，弃上清，留沉淀。

② 沉淀中加入 1mL 蒸馏水，震荡混匀，12000rpm4℃离心 10min，弃上清，留沉淀。

③ 沉淀中加入 1mL 提取液 B 充分混匀，4℃浸提过夜，12000 rpm 4℃离心 20min，取上清置冰上待测。

2、上机检测：

①可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

<table>
<tr><th>试剂名称（μL）</th><th>测定管</th><th>对照管</th></tr>
<tr><td>样本</td><td>100</td><td>100</td></tr>
<tr><td>试剂一</td><td>250</td><td>500</td></tr>
<tr><td>试剂二</td><td>250</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="3">混匀， 37℃准确水浴 20min 后，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀（以保证浓度不变）</td></tr>
<tr><td>试剂三</td><td>250</td><td>250</td></tr>
</table>

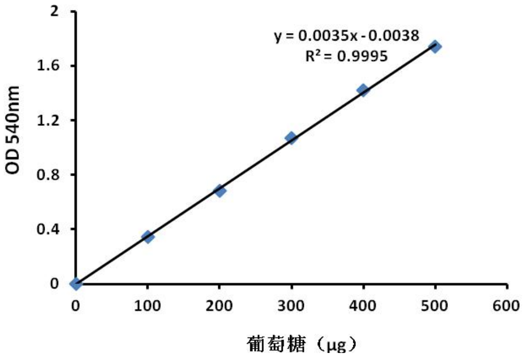
混匀，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中，540nm 处读取吸光值 A，ΔA=A 测定-A 对照（每个测定管需设一个对照管）。

【注】：1.若吸光值大于 1.5，可以用蒸馏水稀释样本后测定，计算公式中乘以相应稀释倍数 D。

2.若ΔA 值在零附近徘徊，可增加样本加样体积 V1（如增至 200μL，则试剂一相应减少），或延长 37℃水浴时间（如增至 40min 或更长），则相应的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 y = 0.0035x - 0.0038；x 为标准品质量（μg），y 为ΔA。



2、按蛋白浓度计算：

单位定义：37℃每毫克蛋白每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

细胞壁不溶性酸性转化酶(B-AI)(μg/min/mg prot)=[(ΔA+0.0038)÷0.0035]÷(V1×Cpr)÷T×D

=142.9×(ΔA+0.0038)÷Cpr×D

3、按鲜重计算：

单位定义：37℃每克组织每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

细胞壁不溶性酸性转化酶(B-AI) (μg/min/g 鲜重)=[ΔA+0.0038)÷0.0035]÷(W×V1÷V)÷T×D

=142.9×(ΔA +0.0038)÷W×D

V---加入提取液体积，1mL；　　V1---加入反应体系中样本体积，0.1mL；

T---反应时间，20min；　　W---样本鲜重，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒；

附：标准曲线制作过程：

1 制备标准品母液（5mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存）。

2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 1, 2, 3, 4, 5. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 按照：100μL 标准品+500μL 试剂一+250μL 试剂三，依次加样操作，95℃水浴 10min，冷却后，全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中，540nm 下测定，根据结果即可制作标准曲线。