

细胞壁不溶性酸性转化酶 (B-AI) 检测试剂盒 (分光光度法)

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 510nm 光吸收增加速率与 B-AI 活性成正比。

试剂组成和配制：

提取液 1：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存；

提取液 2：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 25mL 试剂一充分溶解备用；用不完的试剂 4℃ 保存；

试剂三：液体 30mL×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:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	200	200
试剂一		800
试剂二	800	

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	500	500
-----	-----	-----

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, 510nm 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), $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

B-AI 活性计算:

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 (μg/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 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{B-AI 活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.001) \div 0.0016 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 20.8 \times (\Delta A + 0.001) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按鲜重计算:

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

$$\begin{aligned} \text{C-AI 活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.001) \div 0.0016 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 20.8 \times (\Delta A + 0.001) \div W \end{aligned}$$

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。