

## 可溶性酸性转化酶（S-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。S-AI 主要存在于细胞液泡或自由空间中，最适 pH 为 4.5~5.0（酸性），通过降解液泡中蔗糖，调节液泡中蔗糖的利用和果实内糖类的积累。

### 测定原理：

S-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 S-AI 活性成正比。

### 试剂组成和配制：

提取液：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），进行冰浴匀浆。12000g 4℃ 离心 10min，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),  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

## S-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 ( $\mu\text{g/mL}$ ), 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 $\mu\text{g}$  还原糖定义为一个酶活性单位。

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

(2) 按鲜重计算:

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

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

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。