

酸性转化酶（AI）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0560

规格：50T/24S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 65 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 35 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 40mL 试剂一充分溶解备用；用不完的试剂 2-8℃保存 4 周；
- 2、标准品：10mg 葡萄糖，临用前加入 1mL 蒸馏水溶解，制备 10mg/mL 葡萄糖标准品备用，2-8℃保存 4 周。

产品说明：

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 Ivr 分为酸性转化酶（AI）和中性转化酶（NI）两种类型。AI(EC 3.2.1.26)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。

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 540nm 有特征光吸收，在一定范围内 540nm 光吸收增加速率与 AI 活性成正比。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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。

二、测定步骤：

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





- 2、标准品的制备：将10mg/mL标准品用蒸馏水稀释为成1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0 mg/mL的标准品（0浓度即为空白管）。
- 3、取部分试剂一和试剂二37℃预热10min以上。
- 4、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度（mg/mL）	标准品体积（μL）	蒸馏水体积（μL）	稀释后浓度（mg/mL）
1	10	150	1350	1
2	1	400	100	0.8
3	1	300	200	0.6
4	1	200	300	0.4
5	0.4	200	200	0.2
6	-	-	400	0（即空白管）

备注：下述实验中每个标准管需 200μL 标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光值）。

- 5、操作表：（在1.5mLEP管中依次加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管
样本	200	200	-
试剂一	-	800	-
试剂二	800	-	800
标准品	-	-	200
混匀，37℃准确水浴30min后，煮沸10min左右（缠封口膜，防止爆盖），流水冷却后充分混匀（以保证浓度不变），12000 g，4℃离心5min，取上清。			
上清	900	900	900
试剂三	500	500	500
混匀，煮沸 10min 左右（缠封口膜，防止爆盖），流水冷却后充分混匀，于 540nm 处测定各管吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白（0 mg/mL）。 $\Delta A = A \text{ 测定} - A \text{ 对照}$ ， $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准} - A \text{ 空白}$ 。标准曲线只需做 1-2 次。			

三、AI 活性计算：

- 1、标准曲线的建立：

葡萄糖标准品浓度为 x 轴，以 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线 $y=kx+b$ 。根据标准曲线，将 ΔA 带入方程得到 x（mg/mL）。

- 2、AI活性计算：

- (1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：37℃每 mg 蛋白每分钟产生1μg还原糖定义为一个酶活性单位。

$$AI \text{ 活性 (U/mg prot)} = (x \times V1 \times 1000) \div (V1 \times Cpr) \div T = 33.3 \times x \div Cpr$$

- (2) 按样本质量计算

单位定义：37℃每 g 组织每分钟产生1μg还原糖定义为一个酶活性单位。

$$AI \text{ 活性 (U/g 质量)} = (x \times V1 \times 1000) \div (W \times V1 \div V2) \div T = 33.3 \times x \div W$$



1000: 单位换算系数, $1 \text{ mg/mL} = 1000 \mu\text{g/mL}$; V1: 加入反应体系中样本体积, 0.2mL; V2: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间: 30min。

注意事项:

1. 如果加入试剂三, 煮沸 10min 后有混浊物出现, 建议离心除去沉淀后, 取上清测定吸光度;
2. 如果 ΔA 大于 1.5, 可以用蒸馏水将样本稀释后测定 (计算公式中乘以相应稀释倍数)。
3. 提取液中含有一定浓度的蛋白 (约 1 mg/mL), 所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。

实验实例:

- 1、取 0.1g 黄花芯加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = 0.918$, $\Delta A_{\text{对照}} = 0.752$, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.918 - 0.752 = 0.166$, 带入标准曲线 $y = 1.3885x - 0.1929$, 计算 $x = (0.166 + 0.1929) / 1.3885 = 0.25848$, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{AI 活性 (U/g 质量)} = 33.3 \times x \div W = 33.3 \times 0.25848 \div 0.1 = 86.074 \text{ U/g 质量}$ 。

参考文献:

[1] Huang Y W, Nie Y X, Wan Y Y, et al. Exogenous glucose regulates activities of antioxidant enzyme, soluble acid invertase and neutral invertase and alleviates dehydration stress of cucumber seedlings[J]. Scientia horticulturae, 2013, 162: 20-30.

相关系列产品:

BC0570/BC0575 中性转化酶 (NI) 活性检测试剂盒
BC0580/BC0585 蔗糖合成酶 (SS) 活性检测试剂盒
BC0600/BC0605 蔗糖磷酸合成酶 (SPS) 活性检测试剂盒
BC2460/BC2465 植物蔗糖含量检测试剂盒

