

酸性转化酶（AI）活性检测试剂盒说明书

微量法

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：BC0565

规格：100T/48S

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 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

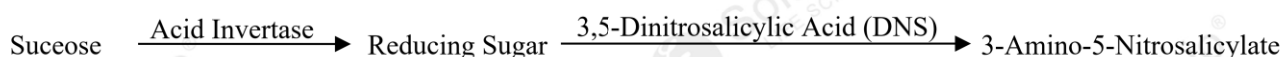
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 15mL 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，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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、标准品的制备：将 10mg/mL 标准品用蒸馏水稀释为 2、1.5、1.0、0.5、0.25、0mg/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°C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	200	800	2
2	2	600	200	1.5
3	2	200	200	1
4	1	200	200	0.5
5	0.5	200	200	0.25
6	-	-	400	0 (即空白管)

备注：下述实验中每个标准管需 50μL 标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光值）。

5、操作表：（在 1.5mL EP 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	50	50	-
试剂一	-	200	-
试剂二	200	-	200
标准品	-	-	50
混匀，37°C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°C离心5min，取上清。			
上清	200	200	200
试剂三	125	125	125
混匀，煮沸 10min 左右（缠封口膜，防止爆盖），流水冷却后充分混匀，吸取 200μL 于 96 孔板或者微量比色皿中，测定 540nm 处各管的吸光值，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

以 ΔA 标准为 y 轴，葡萄糖标准品浓度为 x 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。

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

(2) 按样本质量计算：

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。

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

1000：单位换算系数，1 mg/mL = 1000μg/mL；V1：加入反应体系中样本体积，0.05mL；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 1.8, 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. 由于提取液中含有一定浓度的蛋白 (约 1mg/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 木槿加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清用蒸馏水稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=0.574, ΔA 对照=0.378, $\Delta A=A$ 测定-A 对照=0.574-0.378=0.196, 带入标准曲线 $y=0.7408x - 0.0289$, 计算 $x=(0.196+0.0289)/0.7408=0.304$, 按样本质量计算酶活得:
 AI 活性 (U/g 质量) = $33.3 \times x \div W \times \text{稀释倍数} = 33.3 \times 0.304 \div 0.1 \times 2 = 202.46$ 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

