

可溶性酸性转化酶 (Soluble acid invertase, S-AI) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-ZT007 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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) 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。

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, 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 S-AI 活性成正比。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 用前加入 7.5mL 试剂一充分溶解备用; 3. 用不完的试剂 4℃保存;
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、可溶性酸性转化酶 (S-AI) 活性测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

称样本 0.1g (水分充足的样本可取 0.5g) 于研钵中, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆后转入离心管中。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注意】 若样本含糖量高, 可引起 A 对照值较大如超过 1.6, 即检测背景值过高会影响检测, 可在样本提取过程中增加除糖步骤: 取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 经预冷的 95% 乙醇冰浴匀浆, 4℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 5min; 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入经预冷的 80% 乙醇混匀, 4℃放置 5min; 12000rpm, 4℃离心 5min; 弃上清, 留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液涡旋混匀, 4℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 10min; 留上清, 弃沉淀。上清液置冰上待测。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。
- ② 在 EP 管中依次加入:

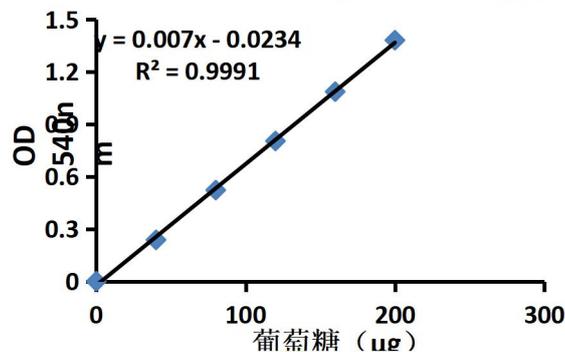
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	100	200
试剂二	100	
混匀, 37°C准确水浴 20min 后, 95°C水浴 10min (用封口膜缠紧, 以防止水分散失), 流水冷却后充分混匀 (以保证浓度不变)。		
试剂三	100	100
混匀, 95°C水浴 10min (用封口膜缠紧, 以防止水分散失), 流水冷却后充分混匀, 吸取 200μL 转移至 96 孔板中, 540nm 处读取吸光值 A, ΔA=A 测定-A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。		

【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 80μL, 则试剂一相应减少), 或延长 37°C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 $y = 0.007x - 0.0234$; x 为标准品质量 (μg), y 为ΔA。



2、按蛋白浓度计算:

单位定义: 37°C每毫克蛋白每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{可溶性酸性转化酶(S-AI)} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0234) \div 0.007] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 178.6 \times (\Delta A + 0.0234) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

3、按鲜重计算:

单位定义: 37°C每克组织每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{可溶性酸性转化酶(S-AI)} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0234) \div 0.007] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 178.6 \times (\Delta A + 0.0234) \div W \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.04mL;

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°C 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。

- 按照：40 μ L 标准品+200 μ L 试剂一+100 μ L 试剂三，依次加样操作，95 $^{\circ}$ C水浴 10min，冷却后，取 200 μ L 至 96 孔板中，540nm 下测定，根据结果即可制作标准曲线。

