

细胞壁不溶性酸性转化酶 (cell-wall binding acid invertase, B-AI)

试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制:

提取液 1: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

提取液 2: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 20mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 10mL 试剂一充分溶解备用; 用不完的试剂 4℃ 保存;

试剂三: 液体 15mL×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:

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 510nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定, (在 EP 管中依次加入下列试剂):

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一		200
试剂二	200	

混匀, 37℃ 准确水浴 30min 后, 95℃ 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	125	125
-----	-----	-----

混匀, 95℃ 水浴 10min (盖紧, 以防止水分散失), 流水冷却后充分混匀, 取 200μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 510nm 处记录各管吸光值 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), $\Delta A = A$ 测定 - A 对照。每个测定管设一个对照管。

B-AI 活性计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

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

(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。

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

$V1$: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL ; $V2$: 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 。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.0008x - 0.001$; 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。

$$\text{B-AI 活性 } (\mu\text{g} / \text{min} / \text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.001) \div 0.0008 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 41.6 \times (\Delta A + 0.001) \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{B-AI 活性 } (\mu\text{g} / \text{min} / \text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.001) \div 0.0008 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 41.6 \times (\Delta A + 0.001) \div W$$

$V1$: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL ; $V2$: 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 。