

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

试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 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、台式离心机、水浴锅、移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制:

提取液 1: 液体 50mL×1 瓶, 4℃ 保存;

提取液 2: 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 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:

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℃ 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	500	500
-----	-----	-----

混匀, 95℃ 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), $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

B-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 (μg/mL), y 为吸光值。

(1) 按蛋白浓度计算:

单位的定义: 37℃每 mg 蛋白每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

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

(2) 按鲜重计算:

单位的定义: 37℃每 g 组织每分钟产生 1μg 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, 0.2mL; 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。