

酸性转化酶（AI）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10167

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，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 20mL 试剂一充分溶解备用；用不完的试剂 4°C保存；
- 2、标准品：10mg 葡萄糖，临用前加入 1mL 蒸馏水溶解，制备 10mg/mL 葡萄糖标准液备用。

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°C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，蒸馏水调零。
- 2、标准品的制备：将标准液用蒸馏水稀释成 2、1.5、1.0、0.5、0.25、0 mg/mL 葡萄糖标准液。
- 3、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
标准液	-	-	50
混匀，37°C准确水浴30min后，煮沸10min左右（盖紧，以防水分散失），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（盖紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，取 200μL 至微量玻璃比色皿或 96 孔板中，540nm 处记录各管吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

三、AI 活性计算

1、标准曲线的建立

以各浓度下吸光值减空白管（浓度为 0mg/mL）的吸光度为 y 轴，葡萄糖浓度为 x 轴绘制标准曲线。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。

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

(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、如果吸光值大于 1，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 $\Delta A_{\text{测定}} = 0.574$ ， $\Delta A_{\text{对照}} = 0.378$ ， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.574 - 0.378 = 0.196$ ，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：

$$\text{AI 活性 (U/g 质量)} = 33.3 \times x \div W \times \text{稀释倍数} = 33.3 \times 0.304 \div 0.1 \times 2 = 202.46 \text{ U/g 质量。}$$

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.