

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

### 分光光度法 50 管/24 样

**注 意：**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。S-AI 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。

#### 测定原理：

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，在 510nm 有特征光吸收，在一定范围内 510nm 光吸收增加速率与 S-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：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。

#### 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)， $\Delta A = A$  测定 -A 对照。

**S-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 ( $\mu\text{g/mL}$ ),  $y$  为吸光值。

(1) 按蛋白浓度计算:

单位的定义:  $37^{\circ}\text{C}$  每  $\text{mg}$  蛋白每分钟产生  $1\mu\text{g}$  还原糖定义为一个酶活性单位。

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

(2) 按鲜重计算:

单位的定义:  $37^{\circ}\text{C}$  每  $\text{g}$  组织每分钟产生  $1\mu\text{g}$  还原糖定义为一个酶活性单位。

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

V1: 加入反应体系中样本体积,  $0.2\text{mL}$ ; V2: 加入提取液体积,  $1\text{mL}$ ; T: 反应时间,  $30\text{min}$ ; Cpr: 样本蛋白质浓度,  $\text{mg/mL}$ ; W: 样本鲜重,  $\text{g}$ 。