

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

微量法 100 管/48 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/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：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：

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（ $\mu\text{L}$ ） | 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 200 $\mu\text{L}$  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)， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

**S-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。

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

(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。

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，0.05mL；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。

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

(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。

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

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。