

## 酸性转化酶（AI）活性检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号：BA1276

产品规格：50管/24样

### 产品简介：

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，将高等植物Ivr分为酸性转化酶（AI）和中性转化酶（NI）两种类型。AI(EC3.2.1.26)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。**

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体50mL×1瓶	4℃
试剂一	液体60mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1瓶	4℃
试剂三	液体35mL×1瓶	4℃
标准品	粉剂×1支	4℃

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入30mL试剂一充分溶解备用；用不完的试剂4℃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。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰、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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

#### 二、测定步骤

1. 分光光度计预热 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 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0mg/mL 葡萄糖标准液。
3. 操作表：（在 1.5mLEP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	对照管	标准管
样本	200	200	-
试剂一	-	800	-
试剂二	800	-	800
标准品	-	-	200



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

混匀，37℃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），12000g，4℃离心 5min，取上清。			
上清	900	900	900
试剂三	500	500	500

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，540nm 处记录各管吸光值 A， $\Delta A = A$  测定 - A 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  $\Delta A$  带入方程得到 x（ $\mu\text{mol/mL}$ ）。

#### 2. AI 活性计算：

##### (1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：37℃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。

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

##### (2) 按样本质量计算

单位的定义：37℃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。

$$\text{AI 活性 (U/g 质量)} = (x \times V1 \times 1000) \div (W \times V1 \div V2) \div T = 33.3 \times x \div W$$

1000：单位换算系数，1mg/mL = 1000 $\mu\text{g/mL}$ ；V1：加入反应体系中样本体积，0.2mL；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 黄花芯加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，测得计算  $\Delta A$  测定 = 0.918， $\Delta A$  对照 = 0.752， $\Delta A = A$  测定 - A 对照 = 0.918 - 0.752 = 0.166，带入标准曲线  $y = 1.3885x - 0.1929$ ，计算  $x = (0.166 + 0.1929) / 1.3885 = 0.25848$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{AI 活性 (U/g 质量)} = 33.3 \times x \div W = 33.3 \times 0.25848 \div 0.1 = 86.074 \text{ U/g 质量。}$$



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com