

细胞壁结合酸性转化酶（CWI）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA2231

产品规格：100T/48S

产品简介：

蔗糖转化酶（Invertase, Inv）不可逆的催化蔗糖裂解形成葡萄糖和果糖，在植物蔗糖代谢中发挥着重要作用。Inv根据最适pH，可分为酸性转化酶（AI）和中性转化酶（NI），其中AI根据亚细胞定位的差异又可分为可溶性酸性转化酶（Soluble acid Invertase, SAI）和细胞壁结合酸性转化酶（Cell wall-bound acid Invertase, CWI）。CWI以离子键的形式结合在细胞壁上，在“库”组织韧皮部蔗糖卸载、蔗糖质外运输、植物的生长发育以及抵抗各种胁迫中起着重要作用。

CWI催化蔗糖降解产生还原糖，还原糖与3,5-二硝基水杨酸反应生成在540nm有特征吸收峰的棕红色物质，通过测定540nm处吸光值变化可计算得CWI活性。

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
提取液一	液体60mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体45mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂三	液体25mL×1瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入20mL试剂一，充分溶解后待用；
2. 标准品：10mg无水葡萄糖。临用前加入1mL蒸馏水充分溶解，配成10mg/mL葡萄糖溶液备用，2-8℃保存一周。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式低温离心机、水浴锅、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水、EP管。

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）

组织：按照质量（g）：提取液一体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g，加入1mL提取液一）加入提取液，冰浴匀浆后于4℃，12000g，离心10min，弃上清，留沉淀；沉淀中加入1mL蒸馏水，充分震荡混匀，4℃，12000g离心10min，弃上清，留沉淀；沉淀中加入1mL提取液二，充分混匀，4℃浸提15h，4℃，12000g，离心10min，取上清置于冰上待测。

二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至540nm，蒸馏水调零。
2. 将10mg/mL标准液用蒸馏水稀释为2、1、0.8、0.6、0.5、0.4、0.3mg/mL的标准溶液备用。
3. 操作表（在1.5mL离心管中操作）：



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

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	标准管	空白管
样本	80	80	-	-
标准溶液	-	-	80	-
蒸馏水	-	-	-	80
试剂一	320	-	320	320
试剂二	-	320	-	-
混匀, 37°C水浴 30min 后, 95°C水浴 10min (盖紧, 防止水分散失)。				
试剂三	200	200	200	200
混匀, 95°C水浴 5min (盖紧, 防止水分散失), 冷却至室温。				
混匀, 取 200μL 置于微量玻璃比色皿/96 孔板中, 测定 540nm 处吸光值 A, 分别记为 A 对照管, A 测定管, A 标准管, A 空白管。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。每个测定管需设一个对照管 (标准曲线只需检测 1-2 次)。				

注意: 如果样本在 37°C 反应后的 95°C 水浴步骤中出现沉淀, 建议室温 12000g, 离心 5min, 取上清 (若上清不足 400μL, 可按比例缩小加样体系, 如 300μL 上清+150μL 试剂三) 进行下一步操作。

三、CWI 活性计算

1. 标准曲线的绘制:

以各个标准溶液的浓度为 x 轴, 其对应的 ΔA 标准为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$, 将 ΔA 带入方程得到 x (mg/mL)。

2. CWI 活性的计算:

(1) 按蛋白浓度计算

酶活定义: 37°C 每 mg 蛋白每分钟分解蔗糖产生 1μg 还原糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{CWI 酶活 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times C_{\text{pr}}) \times 10^3 \div T = 33.33x \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

酶活定义: 37°C 每 g 样本每分钟分解蔗糖产生 1μg 还原糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{CWI 酶活 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{提取}} \times 10^3 \div W \div T = 33.33x \div W$$

V 提取: 提取液二体积, 1mL; 10^3 : 单位换算系数, 1mg = $10^3\mu\text{g}$; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL, 蛋白浓度自行测定; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 30min。

注意事项:

- 当 A 或 ΔA 超过 1.5 时, 建议将样本用提取液二稀释后再进行测定, 计算公式中乘以稀释倍数。
- 95°C 水浴时 EP 管盖紧, 防止水分散失, 待冷却至室温后 (建议每次实验后冷却时间保持一致), 再进行下一步操作, 避免液体飞溅烫伤以及影响试验数据。



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