

CheKine™ 细胞壁不溶性酸性转化酶 (B-AI) 活性检测试剂盒 (微量法)

Cat #: KTB2293

Size: 48 T/24 S 96 T/48 S

	细胞壁不溶性酸性转化酶 (B-AI) 活性检测试剂盒 (微量法)		
REF	货号: KTB2293	LOT	批号: 见产品标签
	适用样本: 植物组织		
	保质期: 4°C, 避光保存 6 个月		

原理

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 (Acid invertase, AI) 和中性转化酶 (Neutral invertase, 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。B-AI 存在于细胞间隙并结合在细胞壁上, 主要参与韧皮部质外体卸载时蔗糖的分解, 以维持库源之间蔗糖的浓度。CheKine™ 细胞壁不溶性酸性转化酶 (B-AI) 活性检测试剂盒 (微量法) 可检测植物组织样本。在该试剂盒中, B-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 510 nm 有特征光吸收, 在一定范围内 510 nm 光吸收增加速率与 B-AI 活性成正比。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Extraction Buffer I	60 mL	120 mL	4°C
Extraction Buffer II	60 mL	120 mL	4°C
Reagent I	16 mL	32 mL	4°C
Reagent II	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4°C
Reagent III	10 mL	20 mL	4°C, 避光保存
Standard	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4°C, 避光保存

注意: 正式检测前, 建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。

自备耗材

- 酶标仪或可见分光光度计 (能测 510 nm 处的吸光度)
- 96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头、1.5 mL 离心管
- 水浴锅、低温离心机
- 去离子水

• 匀浆器或研钵（如果是组织样本）

试剂准备

Extraction Buffer I：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

注意：**Extraction Buffer I** 有刺激性气味，**Reagent III** 有毒且有刺激性气味，建议在通风橱进行实验。

Extraction Buffer II：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

Reagent I：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

Reagent II：临用前配制；48 T 加入 8 mL Reagent I，96 T 加入 16 mL Reagent I，充分溶解。用不完的试剂 4℃保存 2 周。

Reagent III：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。

Standard：临用前配制；加入 1 mL 去离子水，充分溶解得 10 mg/mL，用不完的试剂 4℃保存 1 个月。使用 10 mg/mL Standard，按照下表所示，进一步稀释标准品：

序号	Standard 体积 (μL)	去离子水体积 (μL)	浓度 (mg/mL)
Std.1	200 μL 10 mg/mL Standard	800	2
Std.2	600 μL of Std.1 (2 mg/mL Standard)	200	1.5
Std.3	200 μL of Std.1 (2 mg/mL Standard)	200	1
Std.4	200 μL of Std.3 (1 mg/mL Standard)	200	0.5
Std.5	200 μL of Std.4 (0.5 mg/mL Standard)	200	0.25
Blank	0	400	0

注意：每次实验，请使用新配制的标准品；配制好的标准品需要在 4 h 之内使用。

样本制备

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在 -80℃下保存一个月。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。

植物组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer I，冰浴匀浆，12,000 g，4℃离心 10 min，弃上清，沉淀中加入 1 mL 去离子水，充分震荡混匀，12,000 g，4℃离心 10 min，弃上清，沉淀中加入 1 mL Extraction Buffer II 充分混匀，4℃浸提过夜，12,000 g，4℃离心 20 min，取上清液，置冰上待测。

注意：如需测定蛋白浓度，推荐使用 **Abbkine** 货号：**KTD3002** 的蛋白质定量试剂盒（**Bradford** 法）进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 510 nm，可见光分光光度计用去离子水调零。
2. 操作表（下述操作在 1.5 mL 离心管中操作）：

试剂	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)	对照孔 (μL)	测定孔 (μL)
样本	0	0	50	50
Standard	0	50	0	0
去离子水	50	0	0	0
Reagent I	0	0	200	0
Reagent II	200	200	0	200

混匀，37℃保温 30 min，置 95℃水浴中 10 min（盖紧，防止水分散失），流水冷却。



Reagent III	125	125	125	125
-------------	-----	-----	-----	-----

3. 混匀，95℃水浴 10 min（盖紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，取 200 μL 至 96 孔板或微量玻璃比色皿中，记录 510 nm 处吸光值 A。空白孔记为 A_{空白}，标准孔记为 A_{标准}，对照孔记为 A_{对照}，测定孔记为 A_{测定}。计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。

注意：空白管和标准管只需做 1-2 次。实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本的 $\Delta A_{测定}$ 小于 0.1，可适当增大样本量，如果 $\Delta A_{测定}$ 大于 1,000 nmol/mL 的 $\Delta A_{标准}$ ，样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

注意：我们为您提供的计算公式，包括推导过程计算公式和简洁计算公式。两者完全相等。建议以加粗的简洁计算公式为最终计算公式。

1. 标准曲线的绘制

以标准溶液浓度为 x 轴， $\Delta A_{标准}$ 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程，将 $\Delta A_{测定}$ 带入方程得到 x (mg/mL)。

2. B-AI 含量的计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

酶活单位定义：37℃每毫克蛋白每分钟产生 1 μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$B-AI\ (U/mg\ prot) = x \times V_{样} \div (V_{样} \times Cpr) \div T \times 1,000 = 33.3x \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算：

酶活单位定义：37℃每克样本每分钟产生 1 μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$B-AI\ (U/g\ 鲜重) = x \times V_{样} \div (V_{样} \times W \div V_{样总}) \div T \times 1,000 = 33.3x \div W$$

V_样：加入样本体积，0.05 mL；V_{样总}：加入 Extraction Buffer II 体积，1 mL；T：反应时间，30 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；1,000：换算系数，1 mg/mL=1,000 μg/mL。

注意事项

- 1. 如果加入 Reagent III，95℃水浴 10 min 后有混浊物出现，建议 12,000 g，4℃离心 5 min 后，取上清测定吸光度。
- 2. 由于 Extraction Buffer 中含有一定浓度的蛋白（约 1 mg/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。

结果展示

以下数据仅供参考，实验者需根据自己的实验对样品进行检测。

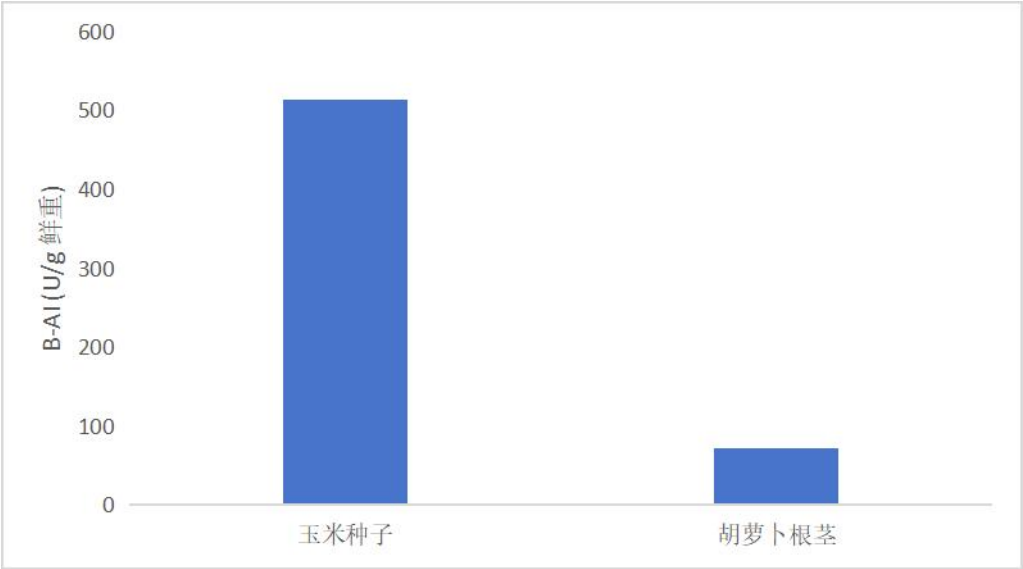


Figure 1. 本试剂盒测定玉米种子和胡萝卜根茎中 B-AI 的活性。

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTB3110	CheKine™ 蔗糖合成酶（SS）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1560	CheKine™ 酰基转移酶（AAT）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1270	CheKine™ 丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒（微量法）

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

