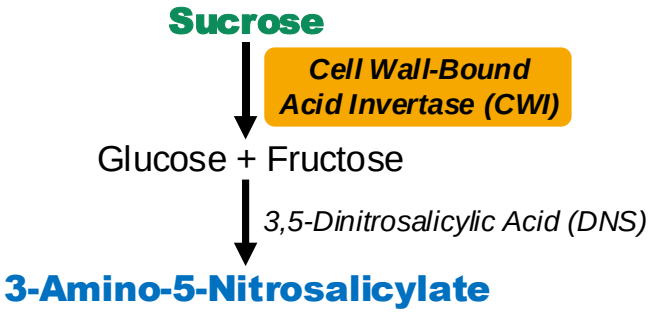
细胞壁结合酸性转化酶（CWI）活性检测试剂盒

Cell Wall-Bound Acid Invertase (CWI) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Catalog Number **AKSU025C**
Storage Temperature **2-8°C**
Size **70T/25S**

Visible Spectrophotometry

细胞壁结合酸性转化酶（CWI）活性检测试剂盒

Cell Wall-Bound Acid Invertase (CWI) Activity Assay Kit

一、产品描述

蔗糖转化酶（Invertase，Ivr）作为催化蔗糖降解的重要酶类，其活性测定对于光合产物贮存、转运及累积的分析具有重要意义。根据蔗糖转化酶最适 pH 可分为酸性转化酶（AI）和中性转化酶（NI），其中酸性转化酶根据亚细胞定位的差异又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），细胞壁结合酸性转化酶以离子键的形式结合在细胞壁上，在蔗糖卸载、蔗糖质外运输、植物生长发育及抵抗胁迫过程中起着重要作用。

细胞壁结合酸性转化酶能够催化蔗糖分解生成还原糖，进一步与 3,5-二硝基水杨酸反应，生成棕红色氨基化合物，产物在 540 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征细胞壁结合酸性转化酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液 A	液体 30 mL×1 瓶	4°C保存	-
提取液 B	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂一	粉剂×3 瓶	4°C保存	**使用前每瓶加入 20 mL 试剂二充分溶解** （配制后 4°C可保存 2 周）
试剂二	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂三	液体 40 mL×1 瓶	4°C避光保存	-
标准品	粉剂×1 支 （10 mg 葡萄糖标准品）	4°C保存	**使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解** （即为 10 mg/mL 葡萄糖标准液）
标准稀释液的制备（现用现配）：使用前将 10 mg/mL 葡萄糖标准液使用蒸馏水稀释至 1.0、0.8、0.6、0.4、0.3、0.25 mg/mL 即为标准稀释液。			

序号	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度（mg/mL）	10	10	10	10	10	10
标准液体积（μL）	100	80	60	40	30	25
蒸馏水体积（μL）	900	920	940	960	970	975
稀释后浓度（mg/mL）	1.0	0.8	0.6	0.4	0.3	0.25

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿（光径 10 mm、狭缝 3 mm、体积 1.05 mL）、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①按照组织质量（g）：提取液 A 体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 **1 mL 提取液 A**）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 10 min，弃上清，**留沉淀**；

②沉淀中加入 **1 mL 蒸馏水**，充分振荡混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，弃上清，**留沉淀；**

③沉淀中加入 **1 mL 提取液 B**，充分振荡混匀，4℃浸提 15 h，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清即为**粗酶液**，置于冰上待测；

2.测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 540 nm，蒸馏水调零。

②**灭活酶液的制备：**吸取 300-500 μL 粗酶液至离心管中，沸水浴处理 10 min（密封以防止水分散失），冷却至室温，充分混匀即为灭活酶液。

③在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管（μL）	对照管（μL）	标准管（μL）	空白管（μL）
粗酶液	200	-	-	-
灭活酶液	-	200	-	-
标准稀释液	-	-	200	-
蒸馏水	-	-	-	200
试剂一	800	800	800	800
充分混匀，37℃准确反应 30 min				
试剂三	500	500	500	500
充分混匀，沸水浴处理 10 min，冷却至室温				

注：沸水浴处理时注意密封以防止水分散失。

吸光值测定：吸取 1 mL 反应液至 1 mL 玻璃比色皿中，测定 540 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算ΔA 测定=A 测定-A 对照，ΔA 标准=A 标准-A 空白。注：每个样品均需设一个对照管，各浓度标准管和空白管只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 1.0、0.8、0.6、0.4、0.3、0.25 mg/mL 为横坐标（x），以其对应的 ΔA 标准为纵坐标（y），绘制标准曲线，得到线性回归方程 y=kx+b，将 ΔA 测定带入公式得到 x（mg/mL）。

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

3.细胞壁结合酸性转化酶（CWI）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：37℃条件下，每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CWI（U/mg prot）} = \frac{x \times V_{提} \times 1000}{Cpr \times V_{提} \times T} = \frac{33.33 \times x}{Cpr}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：37℃条件下，每 g 组织每分钟生成 1 μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CWI（U/g）} = \frac{x \times V_{提} \times 1000}{W \times T} = \frac{33.33 \times x}{W}$$

注释：V 提：粗酶液总体积，1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：酶促反应时间，30 min；1000：单位换算系数，1 mg/mL=1000 μg/mL。

四、注意事项

①若 A 测定或ΔA 测定超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将粗酶液使用提取液 B 适当稀释后再进行测定；低于最低值建议适当增加样本或延长酶促反应时间后再进行测定，计算时相应修改；

②加入试剂三沸水浴处理 10 min 后若出现混浊物，建议离心后取上清再进行吸光值测定；

③提取液中含有一定浓度蛋白（约 1 mg/mL），测定样品蛋白浓度时需减去提取液自身蛋白含量；

④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.