

## 中性/碱性转化酶（Neutral invertase, NI）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-ZT008 微板法 48 样）

### 一、产品简介：

蔗糖酶即蔗糖转化酶（Invertase, E.C.3.2.1.26）在蔗糖代谢中催化蔗糖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 值，蔗糖转化酶分为酸性转化酶（AI）和中性转化酶（NI）两种类型，许多报道均将中性转化酶同碱性转化酶看作一种转化酶。NI 的最适 PH 值在 7.0 左右，主要存在于细胞质中，负责分解细胞质中蔗糖为果糖和葡萄糖。

NI 催化蔗糖分解产生还原糖，进一步与 3,5-二硝基水杨酸反应，生成棕红色氨基化合物，经光谱扫描在 540nm 有特征光吸收，在一定范围内 540nm 光吸收值与还原糖生成量成正比。通过光吸收增加速率来计算 NI 活性

### 二、试剂盒的组成和配制：

| 试剂名称 | 规格          | 保存要求 | 备注                                |
|------|-------------|------|-----------------------------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶 | 4℃保存 |                                   |
| 试剂一  | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃保存 |                                   |
| 试剂二  | 粉剂 1 瓶      | 4℃保存 | 用前加入 7.5mL 试剂一充分溶解备用；用不完的试剂 4℃保存； |
| 试剂三  | 液体 10mL×1 瓶 | 4℃保存 |                                   |
| 标准品  | 粉体 1 支      | 4℃保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂                     |

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、中性/碱性转化酶（NI）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

称样本 0.1g（水分充足的样本可取 0.5g）于研钵中，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆后转入离心管中。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注意】若样本含糖量高，可引起 A 对照值较大如超过 1.6，即检测背景值过高会影响检测，可在样本制备过程中增加除糖步骤：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆，4℃放置 10min；12000rpm，4℃离心 5min；弃上清，留沉淀，向沉淀中加入经预冷的 80%乙醇混匀，4℃放置 5min；12000rpm，4℃离心 5min；弃上清，留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液涡旋混匀，4℃放置 10min；12000rpm，4℃离心 10min；留上清，弃沉淀。上清液置冰上待测。

#### 2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入：

| 试剂名称（μL）                                                           | 测定管 | 对照管 |
|--------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 样本                                                                 | 40  | 40  |
| 试剂一                                                                | 100 | 200 |
| 试剂二                                                                | 100 |     |
| 混匀，37℃准确水浴 20min 后，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀（以保证浓度不变）。 |     |     |
| 试剂三                                                                | 100 | 100 |
| 混匀，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，吸取 200μL 转移至 96 孔板中，      |     |     |

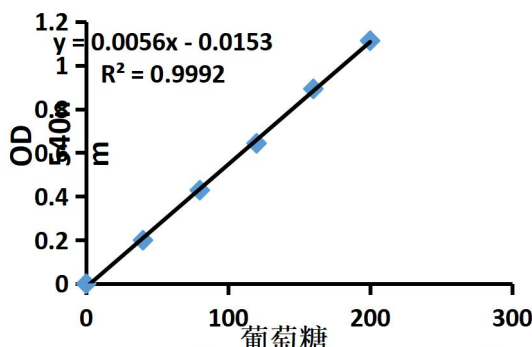
540nm 处读取吸光值 A,  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$  (每个测定管需设一个对照管)。

【注】：1.若吸光值大于 1.5, 可以用蒸馏水稀释样本后测定, 计算公式中乘以相应稀释倍数 D。

2.若  $\Delta A$  值在零附近徘徊, 可增加样本加样体积 V1 (如增至 80 $\mu$ L, 则试剂一相应减少), 或延长 37°C 水浴时间 (如增至 40min 或更长), 则相应的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算:

1、标准曲线方程为  $y = 0.0056x - 0.0153$ ; x 为标准品质量 ( $\mu$ g), y 为  $\Delta A$ 。



2、按蛋白浓度计算:

单位定义: 37°C 每毫克蛋白每分钟产生 1 $\mu$ g 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{NI 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0153) \div 0.0056] \div (V1 \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 223.2 \times (\Delta A + 0.0153) \div C_{\text{pr}}$$

3、按鲜重计算:

单位定义: 37°C 每克组织每分钟产生 1 $\mu$ g 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{NI 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0153) \div 0.0056] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 223.2 \times (\Delta A + 0.0153) \div W$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.04mL;

T---反应时间, 20min;

W---样本鲜重, g;

Cp---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (5mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且 -20°C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 1, 2, 3, 4, 5. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照: 40 $\mu$ L 标准品+200 $\mu$ L 试剂一+100 $\mu$ L 试剂三, 依次加样操作, 95°C 水浴 10min, 冷却后, 取 200 $\mu$ L 至 96 孔板中, 540nm 下测定, 根据结果即可制作标准曲线。