

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

(货号: G0516W 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 mg×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,		

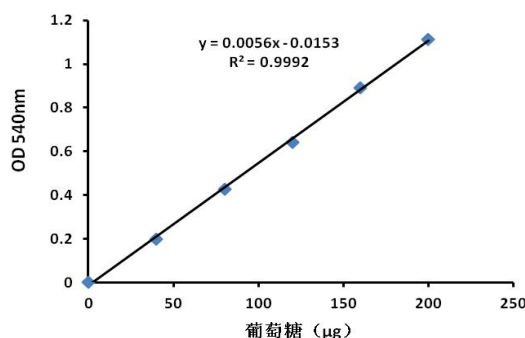
540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管需设一个对照管）。

【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 ΔA 值在零附近徘徊，可增加样本加样体积 V1（如增至 80 μL ，则试剂一相应减少），或延长 37 $^{\circ}\text{C}$ 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（ μg ），y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

单位定义：37 $^{\circ}\text{C}$ 每毫克蛋白每分钟产生 1 μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{NI 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0153) \div 0.0056] \div (V1 \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 223.2 \times (\Delta A + 0.0153) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

3、按鲜重计算：

单位定义：37 $^{\circ}\text{C}$ 每克组织每分钟产生 1 μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{NI 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0153) \div 0.0056] \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 223.2 \times (\Delta A + 0.0153) \div W\end{aligned}$$

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 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 标准品+200 μL 试剂一+100 μL 试剂三，依次加样操作，95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10min，冷却后，取 200 μL 至 96 孔板中，540nm 下测定，根据结果即可制作标准曲线。