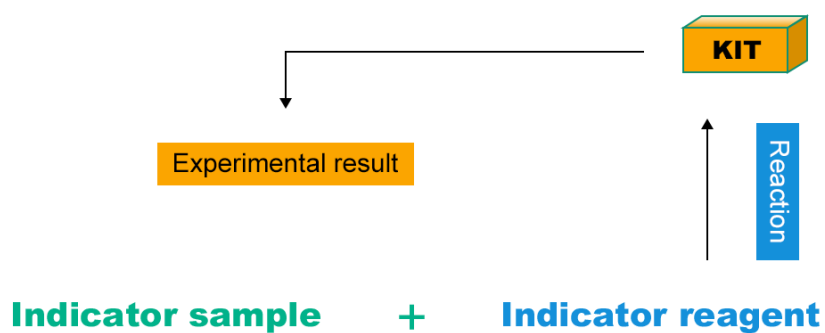


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0510

Size: 100T/48S

中性转化酶 (NI) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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 (AI) 和中性转化酶 (NI) 两种类型。NI 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。

二、测定原理:

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, 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。

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 20mL 试剂一充分溶解备用
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	10mg 无水葡萄糖; 临用前加入 1mL 蒸馏水溶解, 制备 10mg/mL。葡萄糖标准液备用。

五、粗酶液提取：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆；12000g, 4℃, 离心 10min, 取上清，置冰上待测。

六、标准曲线绘制

将标准液用蒸馏水稀释为 2、1.5、1.0、0.5、0.25 mg/mL 葡萄糖标准液，按照测定步骤分别测定 2、1.5、1.0、0.5、0.25、0 mg/mL 葡萄糖标准液在 540nm 下的吸光度 (A)，以各浓度下吸光值减空白管（浓度为 0mg/mL）的吸光度为 y 轴，葡萄糖浓度为 x 轴绘制标准曲线。

七、测定步骤和加样表：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

2、样本测定，（在 1.5mL EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管
粗酶液	50	50	—
试剂一		200	—
试剂二	200		200
标准液	—	—	50
混匀，37℃准确水浴 30min 后，煮沸 10min 左右（盖紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀（以保证浓度不变），12000 g，4℃离心 5min，取全部上清。			
试剂三	125	125	125

混匀，煮沸 10min 左右（盖紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，取 200 μL 至微量玻璃比色皿或 96 孔板中，540nm 处记录各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

八、注意事项：

- 1、如果加入试剂三，煮沸 10min 后有混浊物出现，建议离心除去沉淀后，取上清测定吸光度；
- 2、如果吸光值大于 1，可以用蒸馏水将样本稀释后测定（计算公式中乘以相应稀释倍数）

九、NI 活性计算：

标准条件下测定的回归方程为 $y=kx+b$ ； x 为标准品浓度（mg/mL）， y 为吸光值。

1、按蛋白浓度计算

单位定义：37°C 每 mg 蛋白每分钟产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{NI 活性 (U/mg prot)} = (x \times V1 \times 1000) \div (V1 \times C_{pr}) \div T = 33.3 \times x \div C_{pr}$$

2、按鲜重计算

单位定义：37°C 每 g 组织每分钟产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{NI 活性 (U/g)} = (x \times V1 \times 1000) \div (W \times V1 \div V2) \div T = 33.3 \times x \div W$$

1000: 1 mg/mL = 1000 μ g/mL； $V1$: 加入反应体系中样本体积，0.05mL； $V2$: 加入提取液体积，1mL； C_{pr} : 样本蛋白质浓度，mg/mL； W : 样本鲜重，g； T : 反应时间：30min。