

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-S0794

Size: 50T/24S

## 中性转化酶 (NI) 检测试剂盒说明书

### 可见分光光度法

\*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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰、蒸馏水。

#### 三、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 50mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 60mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 × 1 瓶	4°C 保存	临用前加入 30mL 试剂一充分溶解备用; 用不完的试剂 4°C 保存。
试剂三	液体 35mL × 1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂 × 1 支	4°C 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。

#### 四、粗酶液提取：

按照组织质量 (g) : 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。12000g, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

#### 标准曲线绘制

将标准品稀释成 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0mg/mL 葡萄糖标准液, 按照测定步骤分别测定 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0mg/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。

#### 五、测定步骤及加样表：

1. 分光光度计预热 30min, 波长至 540nm, 蒸馏水调零。
2. 按下表操作：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管
样本	200	200	-
试剂一	-	800	-
试剂二	800	-	800
标准液	-	-	200
混匀, 37°C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°C离心 5min, 取全部上清。			
试剂三	500	500	500

混匀, 煮沸 10min 左右 (盖紧, 以防止水分流失), 流水冷却后充分混匀, 540nm 处蒸馏水调零, 记录各管吸光值 A,  $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ 。

## 六、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）

## 七、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 $\mu$ g 还原糖定义为一个酶活性单位。

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

### 2、按鲜重计算

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

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

1000: 1 mg/mL = 1000 $\mu$ g/mL ; V1: 加入反应体系中样本体积, 0.2mL; V2: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本鲜重, g; T: 反应时间: 30min。