

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

中性转化酶（NI）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	提取液	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。

产品简介：

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。

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

试验中所需的仪器和试剂：

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。

一、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。

二、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。

三、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°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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

四、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）

五、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 1μg 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 1μg 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 = 1000μg/mL ; V1: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL; 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。