

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）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

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

操作步骤：

#### 一、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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

## 二. 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。

## 三、测定步骤及加样表：

分光光度计预热 30min，波长至 540nm，蒸馏水调零。

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

## 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。

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

$x \div Cpr$

### 2、按鲜重计算

单位定义：37°C 每 g 组织每分钟产生 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, 0.2mL; 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。