

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

(货号: G0516F 分光法 24 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 30mL×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 15mL 试剂一充分溶解备用; 用不完的试剂 4℃ 保存;
试剂三	液体 13mL×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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、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】:** 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

#### 2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一		500
试剂二	500	
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	250	250
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, 全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中, 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)。		

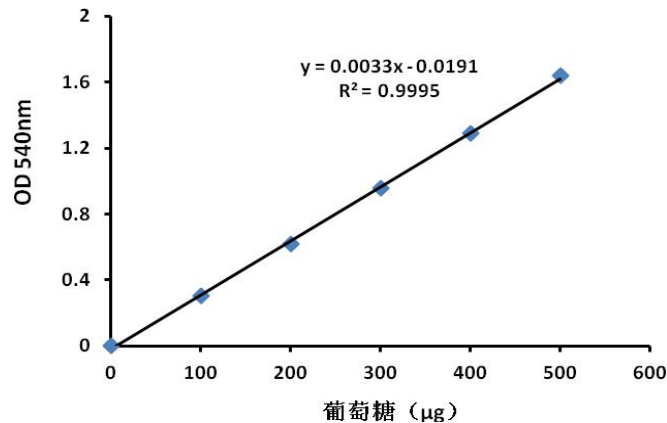
**【注】:** 1. 若吸光值大于 1.5, 可以用蒸馏水稀释样本后测定, 计算公式中乘以相应稀释倍数 D。

2. 若  $\Delta A$  值在零附近徘徊, 可增加样本加样体积 (如增至 150μL), 或延长 37℃ 水浴时间

(如增至 40min 或更长), 则相应的 V1 和反应时间 T 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算:

1、标准曲线方程为  $y = 0.0033x - 0.0191$ ; x 为标准品浓度 ( $\mu\text{g}$ ), y 为  $\Delta A$ 。



2、按蛋白浓度计算:

单位定义: 37°C 每毫克蛋白每分钟产生 1 $\mu\text{g}$  葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{NI 活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0191) \div 0.0033] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 151.5 \times (\Delta A + 0.0191) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

3、按鲜重计算:

单位的定义: 37°C 每克组织每分钟产生 1 $\mu\text{g}$  葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{NI 活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0191) \div 0.0033] \div (W \times V1 \div V2) \div T \times D \\ &= 151.5 \times (\Delta A + 0.0191) \div W \times D \end{aligned}$$

V----加入提取液体积, 1mL;

V1----加入反应体系中样本体积, 0.1mL;

T----反应时间, 20min;

W----样本鲜重, g;

D----未稀释即为 1;

Cpr----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°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: 100 $\mu\text{L}$  标准品+500 $\mu\text{L}$  试剂一+250 $\mu\text{L}$  试剂三, 依次加样操作, 95°C 水浴 10min, 冷却后, 全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中, 540nm 下测定, 根据结果即可制作标准曲线。