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 7.5mL 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。

【注意】若样本含糖量高，可引起 A 对照值较大如超过 1.6，即检测背景值过高会影响检测，可在样本制备过程中增加除糖步骤：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆，4℃放置 10min；12000rpm，4℃离心 5min；弃上清，留沉淀，向沉淀中加入经预冷的 80%乙醇混匀，4℃放置 5min；12000rpm，4℃离心 5min；弃上清，留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液涡旋混匀，4℃放置 10min；12000rpm，4℃离心 10min；留上清，弃沉淀。上清液置冰上待测。

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 试剂一和二可于 37℃条件下孵育 15min 左右，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	250	500
试剂二	250	
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

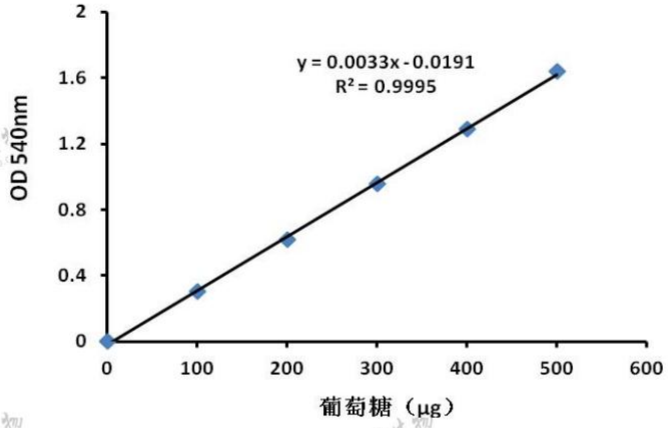
混匀，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中，540nm 处读取吸光值 A，ΔA=A 测定-A 对照（每个测定管需设一个对照管）。

【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ΔA 值在零附近徘徊，可增加样本加样体积 V1（如增至 200μL，则试剂一相应减少），或延长 37℃水浴时间（如增至 40min 或更长），则相应的 V1 和 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（μg），y 为ΔA。



2、按蛋白浓度计算：

单位定义：37℃每毫克蛋白每分钟产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

NI 活性(μg/min/mg prot)=[(ΔA+0.0191)÷0.0033]÷(V1×Cpr)÷T×D

=151.5×(ΔA+0.0191)÷Cpr×D

3、按鲜重计算：

单位定义：37℃每克组织每分钟产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

NI 活性(μg/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0191)÷0.0033]÷(W×V1÷V) ÷T×D

=151.5×(ΔA +0.0191)÷W ×D

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---稀释倍数，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℃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：100μL 标准品+500μL 试剂一+250μL 试剂三，依次加样操作，95℃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。