

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

(货号: ADS-F-ZT008 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°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4°C保存	用前加入 7.5mL 试剂一充分溶解备用; 用不完的试剂 4°C保存;
试剂三	液体 13mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 1 支	4°C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°C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°C放置 10min; 12000rpm, 4°C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°C放置 5min; 12000rpm, 4°C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°C放置 10min; 12000rpm, 4°C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 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°C准确水浴 20min 后, 95°C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°C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		

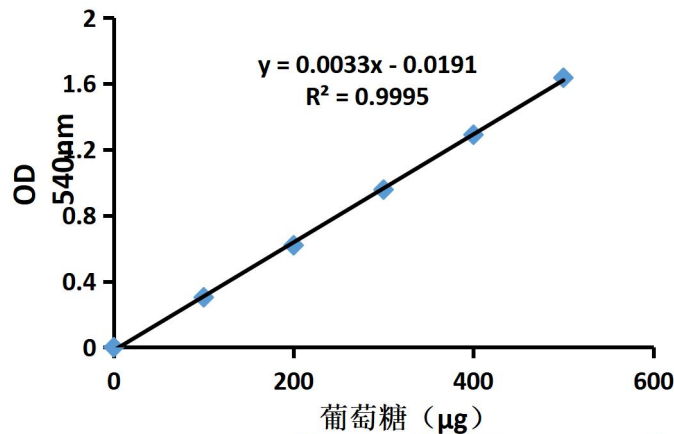
光值 A, $\Delta A = A$ 测定 - A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。

【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 200 μ L, 则试剂一相应减少), 或延长 37 $^{\circ}$ C 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 (μ g), y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算:

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

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

$$= 151.5 \times (\Delta A + 0.0191) \div Cpr \times D$$

3、按鲜重计算:

单位定义: 37 $^{\circ}$ C 每克组织每分钟产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

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

$$= 151.5 \times (\Delta A + 0.0191) \div W \times D$$

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 $^{\circ}$ 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 μ L 标准品 + 500 μ L 试剂一 + 250 μ L 试剂三, 依次加样操作, 95 $^{\circ}$ 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。