

## 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 有效期: 6 个月)

### 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	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 7.5mL 试剂一充分溶解备用; 3. 用不完的试剂 4°C保存;
试剂三	液体13mL×1瓶	4°C避光保存	
标准品	粉体1支	4°C保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

### 三、所需的仪器和用品:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

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

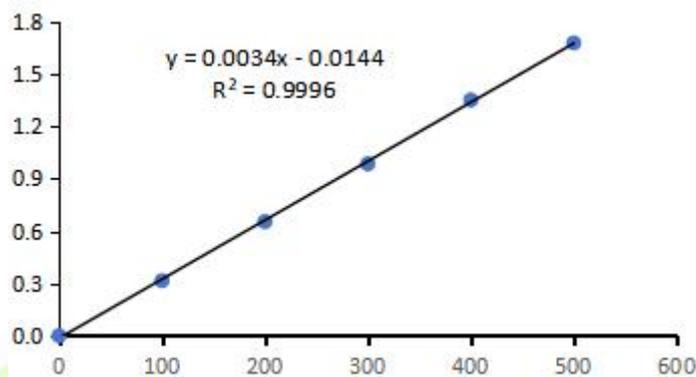
试剂一	250	500
试剂二	250	
混匀，37°C准确水浴 20min 后，95°C水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀（以保证浓度不变）		
试剂三	250	250
混匀，95°C水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中，540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定 - A 对照（每个测定管需设一个对照管）。		

【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 $\Delta A$  值在零附近徘徊，可增加样本加样体积 V1（如增至 200 $\mu$ L，则试剂一相应减少），或延长 37°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  $y = 0.0034x - 0.0144$ ；x 为标准品浓度（ $\mu$ 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 $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{NI 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0144) \div 0.0034] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 147.1 \times (\Delta A + 0.0144) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

3、按鲜重计算：

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

$$\begin{aligned} \text{NI 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0144) \div 0.0034] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 147.1 \times (\Delta A + 0.0144) \div W \times D \end{aligned}$$

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---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 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），标准品母液浓度为 5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 1, 2, 3, 4, 5. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度	0	1	2	3	4	5
------	---	---	---	---	---	---

μg/mL						
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	100	
蒸馏水		100
试剂一	500	500
试剂三	250	250
混匀，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， $\Delta A = A_{测定} - A_{0 浓度管}$ 。		