

中性/碱性转化酶（Neutral invertase, NI）试剂盒说明书

（货号：BP10277W 微板法 48 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×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	1. 开盖前注意使粉剂落入底部（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℃保存；
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 1 支	4℃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、实验器材：

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）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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，可在样本提取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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	100	200

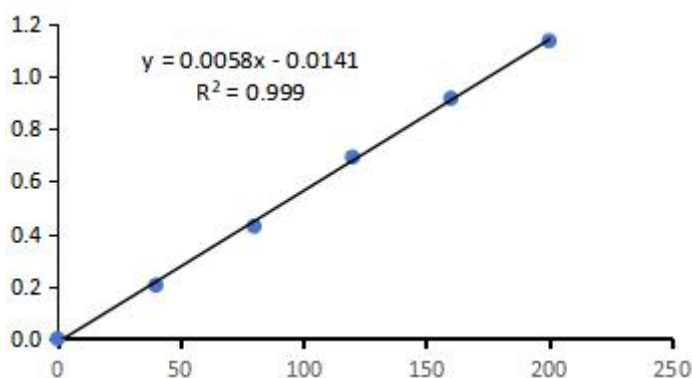
试剂二	100	
混匀, 37°C准确水浴 20min 后, 95°C水浴 10min (用封口膜缠紧, 以防止水分散失), 流水冷却后充分混匀 (以保证浓度不变)。		
试剂三	100	100
混匀, 95°C水浴 10min (用封口膜缠紧, 以防止水分散失), 流水冷却后充分混匀, 吸取 200μL 转移至 96 孔板中, 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A - \text{测定-A 对照}$ (每个测定管需设一个对照管)。		

【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 80μL, 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 $y = 0.0058x - 0.0141$; x 为标准品质量 (μg), y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

单位定义：37°C每毫克蛋白每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{NI 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0141) \div 0.0058] \div (V1 \times Cpr) \div T$$

$$= 215.5 \times (\Delta A + 0.0141) \div Cpr$$

3、按鲜重计算：

单位定义：37°C每克组织每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{NI 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0141) \div 0.0058] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 215.5 \times (\Delta A + 0.0141) \div W$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.04mL;

T---反应时间, 20min;

W---样本鲜重, g;

Cp---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	40	
蒸馏水		40
试剂一	200	200
试剂三	100	100
混匀，95℃水浴 10min，冷却后，取 200μL 至 96 孔板中，540nm 下测定， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		