

中性转化酶（Neutral invertase, NI）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

蔗糖转化酶（Invertase, Ivr）催化蔗糖不可逆地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，将高等植物 Ivr 分为酸性转化酶（AI）和中性转化酶（NI）两种类型。

NI 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。

测定原理：

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，在 510nm 有特征光吸收，在一定范围内 510nm 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

自备用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 25mL 试剂一充分溶解备用；用不完的试剂 4℃ 保存；

试剂三：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存；

粗酶液提取：

按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。12000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤和加样表：

| 试剂名称（ μL ） | 测定管 | 对照管 |
|-----------------------|-----|-----|
| 样本 | 200 | 200 |
| 试剂一 | | 800 |
| 试剂二 | 800 | |

混匀，37℃ 准确水浴 30min 后，95℃ 水浴 10min（盖紧，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 | 500 | 500 |
|-----|-----|-----|

混匀，95℃ 水浴 10min（盖紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，510nm 处蒸馏水调零，记录各管吸光值 A，如果吸光值大于 2，可以用蒸馏水稀释后测定（计算公式中乘以相应稀释倍数）， $\Delta A = A$ 测定 - A 对照。

NI 活性计算：

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.0016x - 0.001$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$), y 为吸光值。

(1) 按蛋白浓度计算:

单位的定义: 37°C 每 mg 蛋白每分钟产生 $1\mu\text{g}$ 还原糖定义为一个酶活性单位。

NI 活性 ($\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}$) = $[(\Delta A + 0.001) \div 0.0016 \times V1] \div (V1 \times Cpr) \div T = 20.8 \times (\Delta A + 0.001) \div Cpr$

(2) 按鲜重计算:

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

NI 活性 ($\mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$ 鲜重) = $[(\Delta A + 0.001) \div 0.0016 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T = 20.8 \times (\Delta A + 0.001) \div W$

$V1$: 加入反应体系中样本体积, 0.2mL ; $V2$: 加入提取液体积, 1mL ; T : 反应时间, 30min ; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL ; W : 样本鲜重, g 。