

中性转化酶（NI）检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 10mL 试剂一充分溶解备用；用不完的试剂 4℃ 保存；

试剂三：液体 15mL×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：

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 510nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定，（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称（ μL ）	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一		200
试剂二	200	

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	125	125
-----	-----	-----

混匀，95℃水浴 10min（盖紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，取 200μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中，510nm 处记录各管吸光值 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）， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

NI 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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（μg/mL），y 为吸光值。

(1) 按蛋白浓度计算：

单位的定义：37℃ 每 mg 蛋白每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

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

(2) 按鲜重计算：

单位的定义：37℃ 每 g 组织每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

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

V1：加入反应体系中样本体积，0.05mL；

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。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.0008x - 0.001$ ；x 为标准品浓度（μg/mL），y 为吸光值。

(1) 按蛋白浓度计算：

单位的定义：37℃ 每 mg 蛋白每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{NI 活性 (}\mu\text{g/min / mg prot)} &= [(\Delta A + 0.001) \div 0.0008 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 41.6 \times (\Delta A + 0.001) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按鲜重计算：

单位的定义：37℃ 每 g 组织每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{NI 活性 (}\mu\text{g/min / g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.001) \div 0.0008 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 41.6 \times (\Delta A + 0.001) \div W \end{aligned}$$

V1：加入反应体系中样本体积，0.05mL；

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。