

中性转化酶（NI）检测试剂盒（分光光度法）

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 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°C准确水浴 30min 后, 95°C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°C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), $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

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 (μg/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 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

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

(2) 按鲜重计算:

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

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

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。