

## 植物蔗糖中性转化酶（NI）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PYHC1 -M48	植物蔗糖中性转化酶（NI）活性检测 试剂盒说明书	48T	微量法
PYHC1 -M96		96T	

### 一、测定意义：

蔗糖作为植物体内主要的光合产物和运输物质，其代谢强弱对许多生理活动都会产生显著影响。蔗糖转化酶（Invertase, Ivr）作为催化蔗糖降解的重要酶类，其活性测定对于光合产物的贮存、转运及累积的分析具有重要意义。根据蔗糖转化酶最适pH分为酸性转化酶（AI）和中性转化酶（NI）两种类型，酸性转化酶主要存在于细胞质中，负责分解液泡和细胞壁中蔗糖为果糖和葡萄糖。

### 二、测定原理：

中性转化酶催化蔗糖分解生成葡萄糖和果糖，进一步与 3,5-二硝基水杨酸反应，生成棕红色氨基化合物，产物在 540 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值的变化即可表征酸性转化酶的活性。

### 三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 15mL×1 瓶	液体 30mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	2-8℃ 保存
试剂二：用时每瓶粉剂加入蒸馏水 10mL，混匀充分溶解，现用现配。			
试剂三	液体 27mL×1 瓶	液体 54mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂四	液体 27mL×1 瓶	液体 54mL×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品	粉剂 ×1 支	粉剂 ×2 支	2-8℃ 保存
标准品：用时每支粉剂加入蒸馏水 1mL，混匀充分溶解，现用现配。			

### 四、操作步骤：

#### 样本前处理

- 1、组织：按照组织质量（g）:提取液（mL）为1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃ 离心 10 min，取上清置冰上待测。

#### 测定步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至540nm，蒸馏水调零。
2. 测定前将试剂恢复至常温；

3. 将10mg/mL的标准品用蒸馏水稀释成0、0.2、0.4、0.6、0.8、1mg/mL，备用；

4. 操作表：

	测定管	对照管	空白管	标准管
样品 (μL)	50	50	-	-
蒸馏水 (μL)	-	-	50	-
不同浓度标准品 (μL)	-	-	-	50
试剂一 (μL)	200	200	200	200
试剂二 (μL)	50	50	50	50
试剂三 (μL)	-	400	-	-
混匀，37℃孵育 30min				
试剂三 (μL)	400	-	400	400
试剂四 (μL)	400	400	400	400
混匀，100℃沸水煮 5min，冷却至室温				
于波长 540nm 酶标仪测定各管吸光度，每个测定管需要设一个对照管。ΔA=A 测定管 - A 对照管				

#### 四、植物蔗糖中性转化酶 (NI) 活性计算：

##### 1、标准曲线绘制

以吸光度值为横坐标，标准品浓度为纵坐标，绘制标准曲线  $y=kx+b$ ， $x$  为吸光度值， $y$  为标准品浓度 (μg/mL)。根据标准曲线，将  $\Delta A$  带入公式计算出样本浓度 ( $y$ , μg/mL)；

##### 2、组织、细胞样本植物蔗糖酸性转化酶 (NI) 计算

(1) 按样本鲜重计算：

**单位定义：** 每 g 组织每分钟催化水解 1 μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$NI \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [1000 \times y \times V_{\text{样}}] \div (W \times V_1 \div V_{\text{样总}}) \div T$$

(2) 按样本蛋白浓度计算：

**单位定义：** 每 mg 组织蛋白每分钟催化水解 1 μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$NI \text{ (nmol/min/mg prot)} = [1000 \times y \times V_{\text{样}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

**V 反总：** 反应体系总体积， $1 \times 10^{-3}$  L；

**1000：** 1mg/mL=1000 μg/mL；

**V 样：** 加入反应液中的样本体积，0.1mL；

**V 样总：** 加入提取液体积，1mL；

**T：** 反应时间，5min；

**Cpr：** 样本蛋白质浓度，mg/mL；

**W：** 样本质量，g；

## 五、 注意事项：

1、实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测；