

中性转化酶（NI）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0575

规格：100T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入 15mL 试剂一充分溶解备用；用不完的试剂 2-8℃保存 4 周；
2. 标准品：10mg 葡萄糖，临用前加入 1mL 蒸馏水溶解，制备 10mg/mL 葡萄糖标准品备用，2-8℃保存 4 周。

产品说明：

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。

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 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。



注意：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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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。

二、测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、取部分试剂一和试剂二 37℃ 预热 10min 以上。





3、标准品的制备：将 10mg/mL 标准品用蒸馏水稀释为 2.0、1.5、1.0、0.5、0.25、0mg/mL 的标准品（0 浓度即为空白管）。

4、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度（mg/mL）	标准品体积（μL）	蒸馏水体积（μL）	稀释后浓度（mg/mL）
1	10	200	800	2.0
2	2.0	600	200	1.5
3	2.0	200	200	1.0
4	1.0	200	200	0.5
5	0.5	200	200	0.25
6	-	-	400	0（即空白管）

备注：下述实验中每个标准管需 50μL 标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光值）。

5、操作表（在 1.5mL EP 管中依次加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管
样本	50	50	-
试剂一		200	-
试剂二	200		200
标准品	-	-	50

充分混匀，37℃准确水浴30min后，煮沸10min左右（缠封口膜，防止爆盖），流水冷却后充分混匀（以保证浓度不变），12000 g，4℃离心5min，取上清。

上清	200	200	200
试剂三	125	125	125

混匀，煮沸10min左右（缠封口膜，防止爆盖），流水冷却后充分混匀，吸取200μL于96孔板或者微量比色皿中，测定540nm处各管的吸光值，记为A测定、A对照、A标准和A空白（0 mg/mL）。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。标准曲线只需做1-2次。

混匀，煮沸 10min 左右（缠封口膜，防止爆盖），流水冷却后充分混匀，540nm 处蒸馏水调零，记录各管吸光值 A，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白（0 mg/mL）。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。标准曲线只需做 1-2 次。

三、NI 活性计算

1、标准曲线的建立：

以 ΔA 标准为 y 轴，葡萄糖标准品浓度为 x 轴，绘制标准曲线 $y=kx+b$ 。根据标准曲线，将 ΔA 带入方程得到x（mg/mL）。

2、NI活性计算：

（1）按样本蛋白浓度计算

单位定义：37℃每mg蛋白每分钟产生1μg还原糖定义为一个酶活性单位。

NI活性（U/mg prot）= $(x \times V1 \times 1000) \div (V1 \times Cpr) \div T = 33.3 \times x \div Cpr \times F$

（2）按样本质量计算

单位定义：37℃每g组织每分钟产生1μg还原糖定义为一个酶活性单位。



$$\text{NI活性 (U/g 质量)} = (x \times V_1 \times 1000) \div (W \times V_1 \div V_2) \div T = 33.3 \times x \div W \times F$$

1000: 单位换算系数, 1 mg/mL = 1000 μg/mL; V1: 加入反应体系中样本体积, 0.05 mL; V2: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间: 30 min; F: 稀释倍数。

注意事项:

1. 如果加入试剂三, 煮沸 10 min 后有混浊物出现, 建议离心除去沉淀后, 取上清测定吸光度。
2. 如果 ΔA 大于 1.6, 可以用蒸馏水将样本稀释后测定。
3. 由于提取液中含有一定浓度的蛋白 (约 1 mg/mL), 所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。

实验实例:

1. 取 0.1066 g 芒果果实组织, 按照样本提取步骤处理, 将上清稀释 8 倍, 按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测定 540 nm 处反应液吸光度, 计算 ΔA = A 测定 - A 对照 = 0.282 - 0.252 = 0.030, 将 ΔA 代入标准方程 $y = 0.8528x - 0.2786$, $R^2 = 0.9954$, $x = 0.362$ mg/mL, 按照样本质量计算活性得:
NI 活性 (U/g 质量) = $33.3 \times x \div W \times F = 904.66$ U/g 质量。
2. 取 0.05 g 酵母粉按照样本提取步骤处理, 将上清稀释 64 倍, 按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测定 540 nm 处反应液吸光度, 计算 ΔA = A 测定 - A 对照 = 1.265 - 0.075 = 1.190, 将 ΔA 代入标准方程 $y = 0.8528x - 0.2786$, $R^2 = 0.9954$, $x = 1.722$ mg/mL, 按照样本质量计算活性得:
NI 活性 (U/g 质量) = $33.3 \times x \div W \times F = 7.34 \times 10^4$ U/g 质量。

相关发表文献:

- [1] Ma L, Liang C, Cui Y, Du H, Liu H, Zhu L, Yu Y, Lu C, Benjakul S, Brennan C, Brennan MA. Prediction of banana maturity based on the sweetness and color values of different segments during ripening. *Curr Res Food Sci.* 2022 Sep 6;5:1808-1817. doi: 10.1016/j.crfs.2022.08.024. PMID: 36254243; PMCID: PMC9568694.
- [2] Han W, Wang Y, Li H, Diao S, Suo Y, Li T, Sun P, Li F, Fu J. Transcriptome and Metabolome Reveal Distinct Sugar Accumulation Pattern between PCNA and PCA Mature Persimmon Fruit. *Int J Mol Sci.* 2023 May 11;24(10):8599. doi: 10.3390/ijms24108599. PMID: 37239943; PMCID: PMC10217969.
- [3] Shi Y, Zhao Y, Yao Q, Liu F, Li X, Jin X, Zhang Y, Ahammed GJ. Comparative Physiological and Transcriptomic Analyses Reveal Mechanisms of Exogenous Spermidine-Induced Tolerance to Low-Iron Stress in *Solanum lycopersicum* L. *Antioxidants (Basel).* 2022 Jun 27;11(7):1260. doi: 10.3390/antiox11071260. PMID: 35883751; PMCID: PMC9312307.
- [4] Gao L, Wang W, Xu C, Han X, Li Y, Liu Y, Qi H. Physiological and Transcriptomic Analyses Reveal the Effects of Elevated Root-Zone CO₂ on the Metabolism of Sugars and Starch in the Roots of Oriental Melon Seedlings. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 19;23(20):12537. doi: 10.3390/ijms232012537. PMID: 36293393; PMCID: PMC9604077.
- [5] Wu J, Chen H, Chen W, Zhong Q, Zhang M, Chen W. Effect of ultrasonic treatment on the activity of sugar metabolism relative enzymes and quality of coconut water. *Ultrason Sonochem.* 2021 Nov;79:105780. doi: 10.1016/j.ultsonch.2021.105780. Epub 2021 Oct 6. PMID: 34628309; PMCID: PMC8501503.

参考文献:

- [1] Huang Y W, Nie Y X, Wan Y Y, et al. Exogenous glucose regulates activities of antioxidant enzyme, soluble acid





invertase and neutral invertase and alleviates dehydration stress of cucumber seedlings[J]. Scientia horticulturae, 2013, 162: 20-30.

相关系列产品:

BC0560/BC0565 酸性转化酶 (AI) 活性检测试剂盒

BC0580/BC0585 蔗糖合成酶 (SS) 活性检测试剂盒

BC0600/BC0605 蔗糖磷酸合成酶 (SPS) 活性检测试剂盒

BC2460/BC2465 植物蔗糖含量检测试剂盒

