

CheKine™ 中性转化酶 (NI) 活性检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB2291

规格: 48 T/24 S

96 T/48 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 植物组织
	保质期: 4℃, 避光保存 6 个月

01 背景与原理

蔗糖转化酶 (Invertase, Ivr, EC 3.2.1.26) 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 (Acid invertase, AI) 和中性转化酶 (Neutral invertase, 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。

本试剂盒检测原理是 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 540 nm 有特征光吸收, 在一定范围内 540 nm 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。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	120 mL	4℃
Reagent I	10 mL	20 mL	4℃
Reagent II	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃
Reagent III	10 mL	20 mL	4℃, 避光保存
Standard	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃, 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 540 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水	稀释标准品用
其他	匀浆器、恒温培养箱、水浴锅、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3002 的蛋白质定量试剂盒（Bradford 法）。由于 Extraction Buffer 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。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存；有刺激性气味，建议在通风橱进行实验
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Reagent II	临用前配制；48 T 加入 7 mL Reagent I，96 T 加入 14 mL Reagent I，充分溶解待用	未用完的试剂 4℃保存 2 周。
Reagent III	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存；有刺激性气味，建议在通风橱进行实验
10 mg/mL Standard	临用前配制；加入 1 mL 去离子水，充分溶解，即 10 mg/mL 标准品	未用完的试剂 4℃避光保存 1 个月

05-1-2 标准品配制

使用 10 mg/mL 标准品，按照下表所示，进一步稀释标准品。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

序号	标准品 (μL)	去离子水 (μL)	浓度 (mg/mL)
1	200 μL 10 mg/mL	800	2
2	600 μL of 2 mg/mL	200	1.5
3	200 μL of 2 mg/mL	200	1
4	200 μL of 1 mg/mL	200	0.5
5	200 μL of 0.5 mg/mL	200	0.25
空白	0	400	0

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把分装的组织块保存在-80℃，一个月内使用。当准备好进行该项实验时，将样本从-80℃拿出后，冰上解冻。但是请注意，这可能会影响样本的稳定性，实验结果可能会低于预期。

- 植物组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆。12000 g, 4℃ 离心 10 min，取上清，置冰上待测。

05-3 实验步骤

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 540 nm。
2. 检测体系配制：在 1.5 mL 离心管中按照如下方式操作，空白管和标准管只需做 1-2 次，每个测定管均需设置一个对照管。

试剂	空白管 (μL)	标准管 (μL)	对照管 (μL)	测定管 (μL)
样本	0	0	50	50
Standard	0	50	0	0
去离子水	50	0	0	0
Reagent I	0	0	200	0
Working Reagent II	200	200	0	200
混匀，37℃保温 30 min，置于 95℃水浴中 10 min（盖紧，防止水分散失），流水冷却				
Reagent III	125	125	125	125

混匀，95℃水浴 10 min（盖紧，防止水分散失），流水冷却后充分混匀（若有混浊物出现，建议 12000 g，4℃离心 5 min）

3. 吸光度检测：取 200 μL 于 96 孔板中，记录 540 nm 处吸光值。测定管记为 $A_{\text{测定}}$ ，对照管记为 $A_{\text{对照}}$ ，标准管记为 $A_{\text{标准}}$ ，空白管记为 $A_{\text{空白}}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)>进入“技术中心”>查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标准}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线。将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 代入方程得到 y 值 (mg/mL)。

3. NI 活性的计算

- 按样本鲜重计算：

单位的定义：37℃ 每克样本每分钟产生 1 μg 还原糖为一个酶活力单位。

$$\text{NI (U/g)} = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 = 33.3y \div W$$

- 按样本蛋白浓度计算

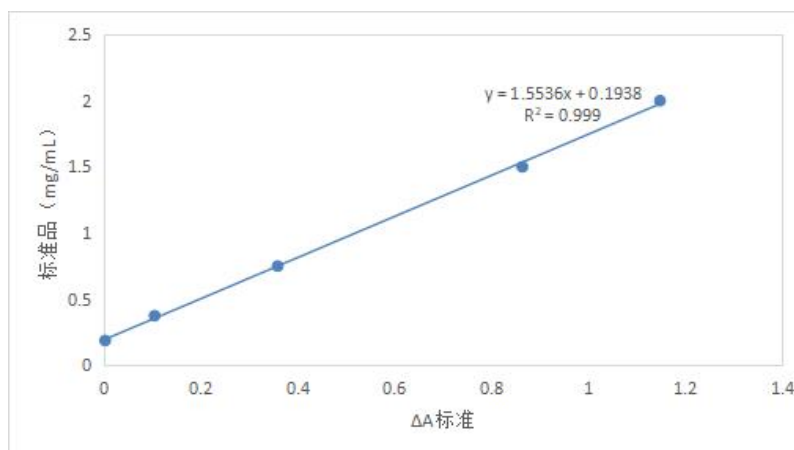
单位的定义：37℃ 每毫克蛋白每分钟产生 1 μg 还原糖为一个酶活力单位。

$$\text{NI (U/mg prot)} = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 1000 = 33.3y \div \text{Cpr}$$

$V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.05 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入 Extraction Buffer 体积，1 mL；T：反应时间，30 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；1000：换算系数，1 mg/mL=1000 $\mu\text{g/mL}$ 。

07 结果展示

典型标准曲线： $y = 1.5536x + 0.1938$ ， $R^2 = 0.999$



示例-1: 取 0.108 g 胡萝卜，按上述步骤检测，使用 96 孔板测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 1.058 - 0.959 = 0.099$ ，代入方程得 $y = 0.348$ ，按样本鲜重计算得：NI (U/g) = $33.3y \div W = 107.3$ U/g。

08 FAQ

- 检测得到的样本 $\Delta A_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办？

如果样本 $\Delta A_{\text{测定}}$ 高于 2 mg/mL 标准品的 $\Delta A_{\text{标准}}$ ，样本需用 Extraction Buffer 适当进行稀释后，重新进行测定。

如果样本的 $\Delta A_{\text{测定}}$ 低于 0.25 mg/mL 标准品的 $\Delta A_{\text{标准}}$ ，可适当提高样本量。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB3110	CheKine™ 蔗糖合成酶 (SS) 活性检测试剂盒 (微量法)
KTB1560	CheKine™ 酰基转移酶 (AAT) 活性检测试剂盒 (微量法)
KTB1270	CheKine™ 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒 (微量法)

CheKine™ 中性转化酶（NI）活性检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB2291)

