

# 蔗糖合成酶（分解方向；SS-I）试剂盒说明书

（ 分光法 24 样）

## 一、产品简介：

蔗糖是叶片等光合产物向各器官运输的主要形态。蔗糖合成酶（Sucrose Synthase, EC 2.4.1.13）是双向反应酶，既可催化蔗糖合成又可催化蔗糖分解，是蔗糖代谢的关键酶之一。研究其分解方向 SS-I 的活性对于植物蔗糖降解以及淀粉合成具有重要意义。

SS-I 催化蔗糖和 UDP 生成游离果糖和 UDPG，采用 3,5-二硝基水杨酸法在 540nm 测定果糖的含量来反映酶活性的高低。

## 二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	A: 液体 2.2mL×1 支	4°C 保存	临用前 A 液全部转移至 B 粉体中，溶解待用，仍-20°C 保存。
	B: 粉体 mg×1 支	-20°C 保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	4°C 保存	
试剂三	液体 5mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

## 三、所需仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、水浴锅、移液器、蒸馏水。

## 四、蔗糖合成酶（分解方向；SS-I）活性检测：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

### 1、样本制备：

#### ① 组织样本：

称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，在 4°C 或冰浴进行匀浆（或使用各类常见电动匀浆器）。12000rpm，4°C 离心 10min，取上清作为待测样品。

**【注意】** 若样本含糖量高，可引起 A 对照值较大如超过 1.6，即检测背景值过高会影响检测，可在样本制备过程中增加除糖步骤：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆，4°C 放置 10min；12000rpm，4°C 离心 5min；弃上清，留沉淀，向沉淀中加入经预冷的 80%乙醇混匀，4°C 放置 5min；12000rpm，4°C 离心 5min；弃上清，留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液涡旋混匀，4°C 放置 10min；12000rpm，4°C 离心 10min；留上清，弃沉淀。上清液置冰上待测。

② 液体样本：直接测定。若浑浊，离心后取上清检测。

### 2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温。

③ 在 EP 管中依次加入：

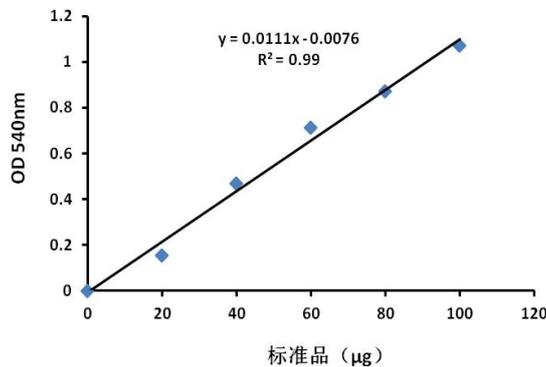
试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	对照管
试剂一	80	
蒸馏水		80
样本	20	20
37°C 准确水浴 30min 后，95°C 水浴 5min		
试剂二	20	20
试剂三	100	100
95°C 水浴 10min（可用封口膜缠紧，防止水份散失），		

取出后冰浴或淋浴至室温		
蒸馏水	540	540
混匀，全部转移至 1mL 玻璃比色皿中，540nm 下测定各管吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管都需设一个对照管。		

- 【注】:** 1. 若  $\Delta A$  值过小如在零附近徘徊，可增加样本的加样体积  $V_1$ （如  $80\mu\text{L}$ ，则蒸馏水相应减少）或增加样本取样量  $W$ （如增至  $0.2\text{g}$ ），或者延长  $37^\circ\text{C}$  水浴时间  $T$ （如  $40\text{min}$  或更长），相应的变量重新代入计算公式计算。
2. 若  $A$  测定的值大于  $1.8$ ，则可对加入比色皿前的液体用蒸馏水稀释，则稀释倍数  $D$  需代入计算公式计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0111x - 0.0076$ ； $x$  为标准品质量（ $\mu\text{g}$ ）， $y$  为  $\Delta A$ 。



2、按照蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生  $1\mu\text{g}$  果糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SS-I活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0076) \div 0.0111] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 150.2 \times (\Delta A + 0.0076) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

3、按照样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟催化产生  $1\mu\text{g}$  果糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SS-I活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0076) \div 0.0111] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D \\ &= 150.2 \times (\Delta A + 0.0076) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每分钟催化产生  $1\mu\text{g}$  果糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SS-I活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0076) \div 0.0111] \div V_1 \div T \times D \\ &= 150.2 \times (\Delta A + 0.0076) \times D \end{aligned}$$

$V$ ---加入提取液体积， $1\text{mL}$ ；

$V_1$ ---加入样本体积， $0.02\text{mL}$ ；

$T$ ---反应时间， $30\text{min}$ ；

$W$ ---样本质量， $\text{g}$ ；

$D$ ---稀释倍数，未稀释即为  $1$ ；

$\text{Cpr}$ ---样本蛋白质浓度， $\text{mg}/\text{mL}$ ；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（ $10\text{mg}/\text{mL}$ ）：向标准品 EP 管里面加入  $1\text{mL}$  蒸馏水（母液需在两天内用且  $-20^\circ\text{C}$  保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品： $0, 1, 2, 3, 4, 5. \text{mg}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据对照管加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。