

## 蔗糖合成酶（合成方向；SS-II）试剂盒说明书

（货号：ADS-F-ZT012 分光法 24 样）

### 一、产品简介：

蔗糖是重要的光合产物，是植物体内运输的主要物质，优势碳水化合物的暂贮形式之一。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。研究其合成方向 SS-II 的活性对于植物蔗糖合成具有重要意义。

SS-II 催化游离果糖与葡萄糖供体 UDPG 反应生成蔗糖，采用蔗糖与间苯二酚反应生成的有颜色产物在 480nm 下有特征吸收峰，酶活力大小与颜色深浅成正比。

### 二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30 mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 2.1 mL×1 支	-20°C 保存	
试剂二	液体 1 mL×1 支	4°C 保存	
试剂三	液体 1 瓶	4°C 保存	临用加入 18 mL 浓盐酸
试剂四	粉剂 2 瓶	4°C 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，每瓶加入 4 mL 蒸馏水充分溶解，现配现用，一周内用完。
标准品	粉剂 1 支	4°C 保存	若重新做标曲，则用到该试剂

### 三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿（光径 1 cm）、水浴锅、台式离心机、移液器、研钵。

### 四、蔗糖合成酶（SS-II）活性测定：

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 0.1 g 组织（水分充足样本可取 0.5 g），加 1 mL 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）。4°C 约 12,000 rpm 离心 10 min，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 0.1 g 组织（水分充足的样本可取 0.5 g），加入 1 mL 经预冷的 95% 乙醇冰浴匀浆，4°C 放置 10 min；12000 rpm，4°C 离心 5 min；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 5 min；12000 rpm，4°C 离心 5 min；弃上清，留沉淀。再向沉淀中加入 1 mL 经预冷提取液涡旋混匀，4°C 放置 10 min；12000 rpm，4°C 离心 10 min；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 分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 480 nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	80	
蒸馏水		80
样本	40	40
37°C 水浴 20 min		
试剂二	20	20
试剂二需直接加到反应液里面，且务必混匀（可用枪头吸		

打), 95°C水浴中煮沸 10min (可用封口膜缠紧, 防止水分散失), 冷却至室温。

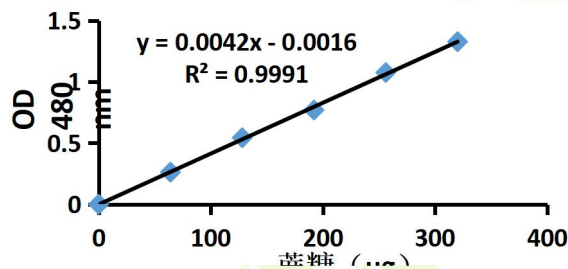
试剂三	400	400
试剂四	120	120

混匀, 95°C水浴 20min, 冷却后, 取全部液体至 1 mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 480nm 下测定。 $\Delta A=A$  测定管 -A 对照管 (每个测定管需设一个对照管)。

【注】: 若 $\Delta A$  值过小如在零附近徘徊, 可延长 37°C水浴时间 T (如 40min 或更长), 或增加样本取样量 W (如增至 0.2g), 或增加样本的加样体积 V1 (如 60 $\mu$ L, 则试剂三相应减少), 相应的变量重新代入计算公式计算。

## 五、结果计算:

1、标准曲线:  $y = 0.0042x - 0.0016$ ; x 为蔗糖标准品质量 ( $\mu$ 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 $\mu$ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SS-II活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0016) \div 0.0042] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ = 297.6 \times (\Delta A + 0.0016) \div \text{Cpr} \times D$$

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 $\mu$ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SS-II活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0016) \div 0.0042] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 297.6 \times (\Delta A + 0.0016) \div W$$

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 $\mu$ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SS-II活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0016) \div 0.0042] \div V1 \div T = 297.6 \times (\Delta A + 0.0016)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.04mL;

T---反应时间, 20 min;

W---样本质量, g;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/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 (10mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20°C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 1.6, 3.2, 4.8, 6.4, 8. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照: 40 $\mu$ L 标准品+80 $\mu$ L 蒸馏水+20 $\mu$ L 试剂二+400 $\mu$ L 试剂三+120 $\mu$ L 试剂四, 依次加样操作, 95°C 水浴 20min, 冷却后, 取全部液体至 1 mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 480nm 下测定, 根据结果即可制作标准曲线。