

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 有效期：6 个月）

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瓶	-20°C保存	
试剂二	液体1mL×1支	4°C保存	
试剂三	液体1瓶	4°C保存	1. 临用加入18mL浓盐酸； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	粉剂2瓶	4°C避光保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 每瓶加入4mL蒸馏水充分溶解； 3. 现配现用，一周内用完。
标准品	粉剂1支	4°C保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、所需的仪器和用品：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

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 0.1g 组织（水分充足样本可取 0.5g），加 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）。4°C 约 12,000rpm 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 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 480nm，蒸馏水调零。

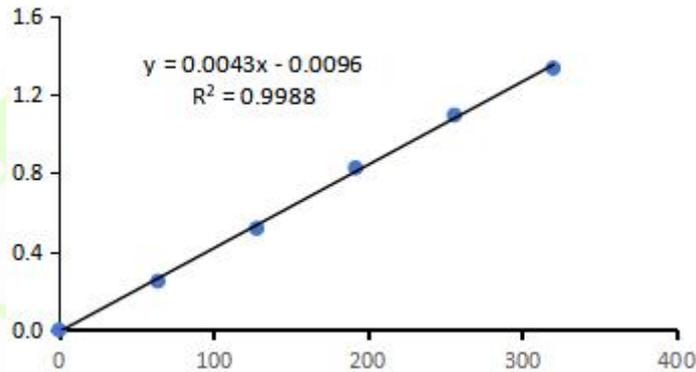
② 在 EP 管中依次加入：

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 20min		
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 ΔA 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 60μL，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： $y = 0.0043x - 0.0096$ ；x 为蔗糖标准品质量（μg），y 为 ΔA 。



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 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SS-II活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0096) \div 0.0043] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 290.7 \times (\Delta A + 0.0096) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

3、按照样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟催化产生 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SS-II活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0096) \div 0.0043] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 290.7 \times (\Delta A + 0.0096) \div W \end{aligned}$$

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 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SS-II活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0096) \div 0.0043] \div V1 \div T = 290.7 \times (\Delta A + 0.0096)$$

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 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存），标准品母液浓度为 10mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 1.6, 3.2, 4.8, 6.4, 8. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 800uL，加入 200uL 蒸馏水，混匀得到 8mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	1.6	3.2	4.8	6.4	8
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据对照管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	40	
蒸馏水	80	120
试剂二	20	20
试剂三	400	400
试剂四	120	120
混匀，95℃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， $\Delta A = A_{测定} - A_{0 浓度管}$ 。		