

蔗糖合成酶（合成方向；SS-II）试剂盒说明书

（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 20 mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	粉剂 mg×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 mg×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 1cm）、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 0.1g 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：

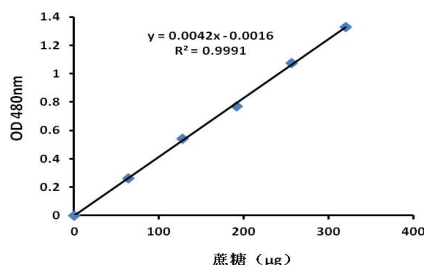
试剂名称（ μL ）	测定管	对照管
试剂一	80	
蒸馏水		80
样本	40	40
37°C 水浴 20min		

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 60 μ 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（ μ g），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 1 μ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

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

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 μ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

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

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 1 μ 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 μ L 标准品+80 μ L 蒸馏水+20 μ L 试剂二+400 μ L 试剂三+120 μ 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。