

## 蔗糖合成酶 (SS) 测试盒说明书

(微板法 48T)

## 一、测定原理:

SS 催化游离果糖与葡萄糖供体 UDPG 反应生成蔗糖, 再用蔗糖与间苯二酚反应生成的物质在 480nm 处测定吸光值来测定蔗糖含量, 从而可以计算 SS 的活性。

## 二、检测意义:

蔗糖合成酶 (Sucrose Synthase, SS) 既对蔗糖合成起主要作用, 又在根部蔗糖贮藏过程中起重要的调节作用, 根中蔗糖贮藏开始的特点是蔗糖合成酶的活力出现并随之增高。通过蔗糖合成酶的作用, 当蔗糖合成酶分解活性大于其合成活性时, 蔗糖即被分解, 形成大量同化器官建成需要的基础物质; 而当蔗糖合成酶合成活性大于其分解活性时, 则有利于蔗糖的形成。所以在植物的生育过程中, 蔗糖合成酶活性的调节在蔗糖代谢分配上显得尤为重要。

## 三、试剂组成及配制:

试剂	规格	保存
提取液	30mL×1瓶	4℃保存
试剂一	液体2.1mL×1支	-20℃以下保存
试剂二	液体1mL×1支	4℃保存
试剂三	液体20mL×1瓶	4℃保存
试剂四	粉剂×2支	4℃保存
试剂四应用液	配制: 临用前取一支粉剂中加入 4mL 蒸馏水, 溶解后备用, 一周内用完	
标准品	粉剂×1支	4℃保存

## 三、样本前处理:

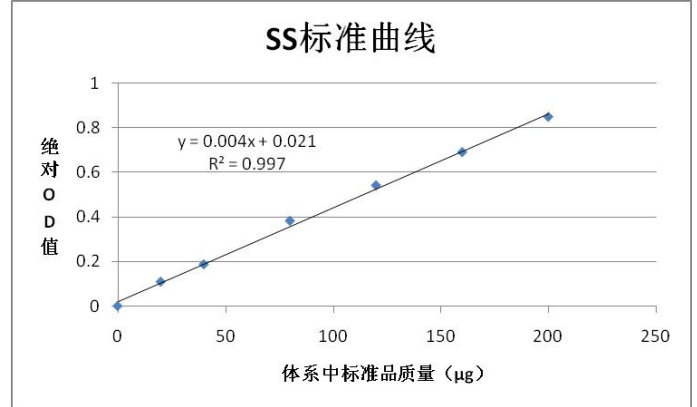
- 组织样本: 将植物组织用生理盐水漂洗干净, 滤纸吸干, 准确称重, 按重量 (g): 体积 (ml) = 1:9 的比例 (水分含量多的样本可用 1:2 的比例) 加入提取液, 冰水浴条件下匀浆制成 10% 的匀浆液, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清待测。(如需测蛋白浓度, 蛋白定量试剂盒本所有售)
- 液体样本: 直接测定。如有浑浊, 4000 转/分离心 2 分钟后取上清液待测。

## 四、操作步骤: (在离心管中操作)

	测定管	对照管
蒸馏水 (μL)		40
样本 (μL)	20	20
试剂一 (μL)	40	
混匀, 37℃水浴 20min		
试剂二 (μL)	10	10
混匀, 95℃水浴 10min, 取出流水冷却		
试剂三 (μL)	200	200
试剂四应用液 (μL)	60	60
混匀, 95℃水浴 20min 后, 取出流水冷却, 吸取 200μL 反应液到 96 孔板中 (注意不要吸入气泡), 480nm 处, 酶标仪读取各孔 OD 值, ΔA=A 测定-A 对照		

## 五、计算公式及举例:

- 标准曲线:** (往标准品粉剂中加入 1mL 蒸馏水, 配成 10mg/mL 标准液, 再用蒸馏水稀释成 1、2、4、6、8、10mg/mL 浓度, 按照 20μL 标准品+40μL 蒸馏水+10μL 试剂二+200μL 试剂三+60μL 试剂四应用液依次加样, 混匀 95℃水浴 20min, 流水冷却, 取 200μL 反应液 480nm 处酶标仪读数)



## 2、按蛋白浓度计算:

**单位定义:** 每毫克组织蛋白每分钟转化底物生成 1μg 蔗糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{SS活性} \left( \frac{\mu\text{g}/\text{min}/\text{mgprot}}{\right)} = \frac{\Delta A - 0.021}{0.004} \div T \div \text{Cpr} \times V_{\text{样}}$$

**T:** 反应时间, 20min;

**Cpr:** 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白);

**V<sub>样</sub>:** 样本加入量, 0.02mL。

## 3、按样本鲜重计算:

**单位定义:** 每克组织每分钟转化底物生成 1μg 果糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{SS活性} \left( \frac{\mu\text{g}/\text{min}/\text{g鲜重}}{\right)} = \frac{\Delta A - 0.021}{0.004} \div T \div \left( \frac{W}{V_{\text{样总}}} \times V_{\text{样}} \right)$$

**T:** 反应时间, 20min;

**W:** 样本质量, g;

**V<sub>样总</sub>:** 前处理时加的提取液的总体积, mL;

**V<sub>样</sub>:** 样本加入量, 0.02mL。

## 七、注意事项:

- 测试前尽量选 1-2 个样本做预试, 以确定样本适宜浓度及实验流程;
- 制备样本上清时可按实际情况制备所需样本浓度, 提取液加入比例可按 1: 5~10 进行;
- 如果自己制备标准曲线, 则所测样本数降低; 如果不做标准曲线, 可按公式直接计算;
- 样本蛋白浓度, 可用本公司的 A045 系列 (BCA 法或考马斯亮蓝法) 进行测定;
- 若 ΔA 偏小 (或在零附近徘徊), 可增加样本加样体积 (如 30μL, 则加入试剂三体积相应减少), 或提高样本浓度 (如 0.2g 加 1mL 提取液提取), 或延长 37℃ 反应时间 (如 40min, 计算时相应的变量代入计算公式计算);
- 如样本 ΔA 值大于 0.6, 则需将样本上清稀释以后进行测定;
- 95℃水浴时, 可将离心管口缝隙用封口膜封紧后进行;
- 每个样本都需设定一个对照管。