

蔗糖合成酶（分解方向；SS-I）试剂盒说明书

微量法 100管/48样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

蔗糖是源（叶片等）光合产物向“库”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。

测定原理

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测定还原糖的含量来反映酶活性的高低。

需自备的仪器和用品

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、离心机、移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰

试剂的组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存；

试剂一：液体10mL×1瓶，4°C保存；

试剂二：液体5mL×1瓶，4°C保存；

试剂三：粉剂×2支，-20°C保存；临用前每支加入1.2mL试剂二充分溶解待用，现配现用；

试剂四：液体6mL×1瓶，4°C保存。

样品测定的准备：

按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4°C离心10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至540nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定，（在EP管中依次加入下列试剂）：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	对照管
样本	10	10
试剂三	40	
试剂一		40

混匀，30°C准确水浴30min后，95°C水浴10min

试剂四	50	50
-----	----	----

95°C水浴5min左右，冷却至室温

蒸馏水	400	400
-----	-----	-----

混匀，取200 $\mu$ L至微量石英比色皿或96孔板中，540nm下测定各管

吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需要设一个对照管。

SS-I活性计算

**a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下**

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0012x - 0.0492$ ； $x$ 为标准品浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）， $y$ 为 $\Delta A$ 。

2、按照蛋白浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟催化产生1 $\mu\text{g}$ 还原糖定义为一个酶活力单位。

SS-I活性( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}$ ) =  $(\Delta A + 0.0492) \div 0.0012 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$

=  $138.9 \times (\Delta A + 0.0492) \div C_{\text{pr}}$

3、按照样本鲜重计算

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

SS-I活性( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{g鲜重}$ ) =  $(\Delta A + 0.0492) \div 0.0012 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

=  $138.9 \times (\Delta A + 0.0492) \div W$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.05mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； $T$ ：反应时间，30 min； $C_{\text{pr}}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL； $W$ ：样本质量，g。

**b.用96孔板测定的计算公式如下**

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0006x - 0.0492$ ； $x$ 为标准品浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）， $y$ 为 $\Delta A$ 。

2、按照蛋白浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟催化产生1 $\mu\text{g}$ 还原糖定义为一个酶活力单位。

SS-I活性( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}$ ) =  $(\Delta A + 0.0492) \div 0.0006 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$

=  $277.8 \times (\Delta A + 0.0492) \div C_{\text{pr}}$

3、按照样本鲜重计算

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

SS-I活性( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{g鲜重}$ ) =  $(\Delta A + 0.0492) \div 0.0006 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

=  $277.8 \times (\Delta A + 0.0492) \div W$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.05mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； $T$ ：反应时间，30 min； $C_{\text{pr}}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL； $W$ ：样本质量，g。