

## 蔗糖合成酶（分解方向；SS-I）试剂盒说明书

（货号：G0513W 微板法 48 样）

### 一、产品简介：

蔗糖是叶片等光合产物向各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。

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在 540nm 测定果糖的含量来反映酶活性的高低。

### 二、测试盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	A: 液体 1.1mL×2 支 B: 粉体 mg×2 支	4°C 保存	临用前一支 A 液全部转移至一支 B 粉体中，溶解待用，仍-20°C 保存。
		-20°C 保存	
试剂二	液体 1.5mL×1 支	4°C 保存	
试剂三	液体 6mL×1 棕色瓶	4°C 保存	
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：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、移液器、蒸馏水。

### 四、蔗糖合成酶（分解方向；SS-I）活性检测：

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（水分充足的样本可取 0.5g），加入 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)。12,000rpm，4°C 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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

##### ② 在 EP 管中依次加入：

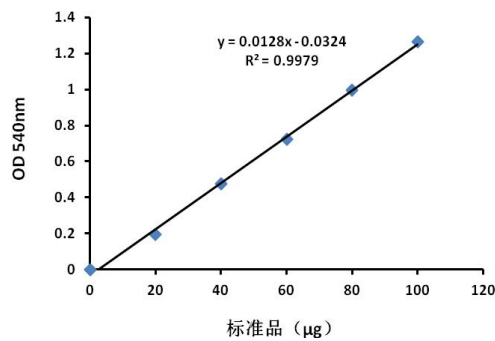
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	40	
蒸馏水		40
样本	10	10
37°C 准确水浴 30min 后，95°C 水浴 5min		
试剂二	10	10
试剂三	50	50
95°C 水浴 10min（可用封口膜缠紧，防止水份散失），		

取出后冰浴或淋浴至室温		
蒸馏水	200	200
混匀，取 200 $\mu$ L 至 96 孔板中，540nm 下测定各管吸光值。 $\Delta A=A$ 测定管-A 对照管（每个测定管都需设一个对照管）。		

- 【注】: 1. 若 $\Delta A$  值过小如在零附近徘徊，可增加样本的加样体积 V1（如 20 $\mu$ L，则蒸馏水相应减少）或增加样本取样量 W（如增至 0.2g），或者延长 37 $^{\circ}$ C 水浴时间 T（如 40min 或更长），相应的变量重新代入计算公式计算。
2. 若 A 测定的值大于 1.5，则可对加入 96 孔板前的的液体用蒸馏水稀释，则稀释倍数 D 需代入计算公式计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0128x - 0.0324$ ；x 为标准品质量（ $\mu$ 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 果糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SS-I活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0324) \div 0.0128] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 260.42 \times (\Delta A + 0.0324) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

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  $\mu$ g 果糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SS-I活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0324) \div 0.0128] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 260.42 \times (\Delta A + 0.0324) \div W \times D \end{aligned}$$

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  $\mu$ g 果糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SS-I活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0324) \div 0.0128] \div V1 \div T \times D \\ &= 260.42 \times (\Delta A + 0.0324) \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.01 mL；

T---反应时间，30 min； W---样本质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

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 $^{\circ}$ C 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 2, 4, 6, 8, 10. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据对照管加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。