

蔗糖合成酶（合成方向；SS-II）试剂盒说明书

（货号：BP10274W 微板法 48 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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、试剂盒组分与配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60ml×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 2.1ml×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 1ml×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 1 瓶	4℃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℃避光保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 每瓶加入 4mL 蒸馏水充分溶解，现配现用，一周内用完。
标准品	粉剂 1 支	4℃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、实验器材：

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）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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，进行冰浴匀浆。12,000rpm 4℃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，可在样本提取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℃放置 10min；12000rpm，4℃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℃放置 5min；12000rpm，4℃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℃放置 10min；12000rpm，4℃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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 480nm。

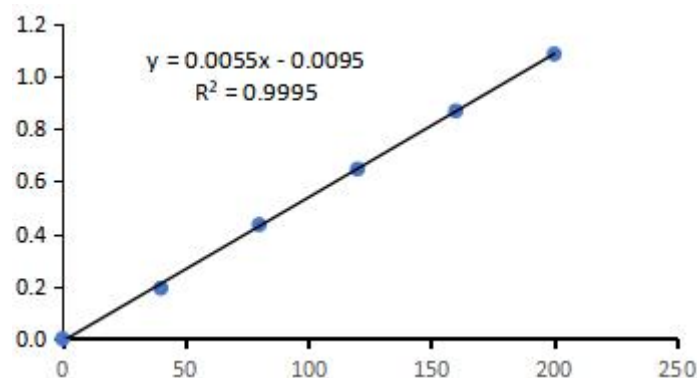
② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
试剂一	40	
蒸馏水		40
样本	20	20
37°C水浴 20min		
试剂二	10	10
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水浴煮沸 10min（可用封口膜缠紧，防止水分散失），冷却至室温。		
试剂三	200	200
试剂四	60	60
混匀，95°C水浴 20min，冷却后，取 200μL 至 96 孔板中，480nm 下测定。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （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），或者增加样本加样体积 V1（如 40μL，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： $y = 0.0055x - 0.0095$ ；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。

$$\text{SS-II活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0095) \div 0.0055] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 454.5 \times (\Delta A + 0.0095) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{SS-II活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0095) \div 0.0055] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 454.5 \times (\Delta A + 0.0095) \div W$$

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。

$$\text{SS-II活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0095) \div 0.0055] \div V1 \div T = 454.5 \times (\Delta A + 0.0095)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02 mL；

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, 2, 4, 6, 8, 10. 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：

标品浓度 mg/mL	0	2	4	6	8	10
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	20	
蒸馏水	40	60
试剂二	10	10
试剂三	200	200
试剂四	60	60
混匀, 95℃水浴 20min, 冷却后, 取 200μL 至 96 孔板中, 480nm 下测定, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		