

蔗糖合成酶（分解方向；SS-I）试剂盒说明书

（货号：BP10275F 分光法 24 样 有效期：6 个月）

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、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	A: 液体 2.2mL×1 瓶 B: 粉体 1 瓶	4℃保存	1. 临用前 A 液全部转移至 B 粉体中，溶解待用，仍-20℃保存。
		-20℃保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	
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、所需仪器和用品：

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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

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（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，在 4℃ 或冰浴进行匀浆（或使用各类常见电动匀浆器）。12000rpm，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℃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、上机检测：

① 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温。

③ 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	20	20

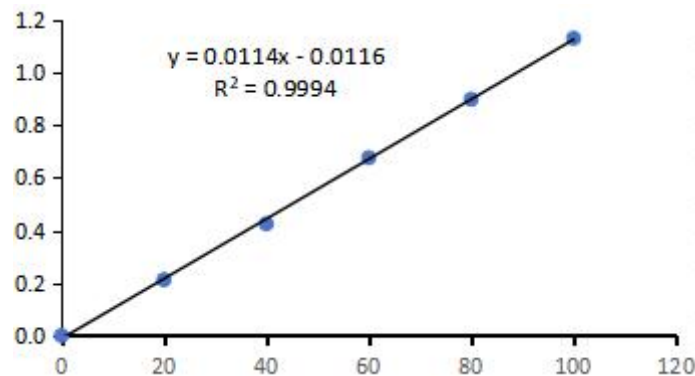
37°C准确水浴 30min 后, 95°C水浴 5min		
试剂二	20	20
试剂三	100	100
95°C水浴 10min (可用封口膜缠紧, 防止水份散失), 取出后冰浴或淋浴至室温		
蒸馏水	540	540
混匀, 全部转移至 1mL 玻璃比色皿中, 540nm 下测定各管吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管都需设一个对照管。		

【注】：1. 若 ΔA 值过小如在零附近徘徊, 可增加样本的加样体积 V_1 (如 80 μ 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°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 1.8, 则可对加入比色皿前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： $y = 0.0114x - 0.0116$; x 为标准品质量 (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 果糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SS-I活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0116) \div 0.0114] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 146.2 \times (\Delta A + 0.0116) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

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 果糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SS-I活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0116) \div 0.0114] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D \\ &= 146.2 \times (\Delta A + 0.0116) \div W \times D \end{aligned}$$

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 μ g 果糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SS-I活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0116) \div 0.0114] \div V_1 \div T \times D \\ &= 146.2 \times (\Delta A + 0.0116) \times D \end{aligned}$$

V ---加入提取液体积, 1 mL;

V_1 ---加入样本体积, 0.02mL;

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 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), 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, 1, 2, 3, 4, 5. 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：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 5mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	1	2	3	4	5
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	80	100
37°C准确水浴 30min 后，95°C水浴 5min		
试剂二	20	20
试剂三	100	100
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	540	540
混匀，全部转移至 1mL 玻璃比色皿中，540nm 下测定吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{测定-0 浓度管}}$		