

蔗糖合成酶（分解方向；SS-I）试剂盒说明书

（货号：BP10275W 微板法 48 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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	A: 液体 1.1mL×2 支	4℃ 保存	1. 临用前一支 A 液全部转移至一支 B 粉体中，溶解待用，仍-20℃保存。
	B: 粉体 2 支	-20℃ 保存	
试剂二	液体 1.5mL×1 支	4℃ 保存	
试剂三	液体 6mL×1 棕色瓶	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、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，在 4℃ 或冰浴进行匀浆（或使用各类常见电动匀浆器）。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 540nm。

② 在 EP 管中依次加入：

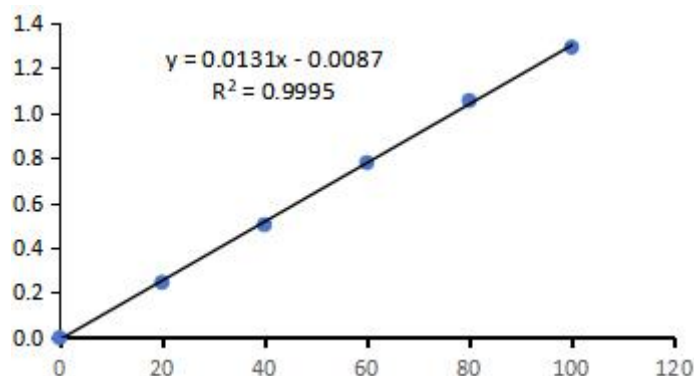
试剂组分（μL）	测定管	对照管
试剂一	40	
蒸馏水		40
样本	10	10
37℃ 准确水浴 30min 后，95℃ 水浴 5min		

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 200μL 至 96 孔板中，540nm 下测定各管吸光值。 ΔA=A 测定管-A 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 V1（如 20μL，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 1.5，则可对加入 96 孔板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 = 0.0131x - 0.0087；x 为标准品质量（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 1 μg 果糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SS-I活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.0131] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D$$

$$= 254.5 \times (\Delta A + 0.0087) \div \text{Cpr} \times D$$

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 μg 果糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SS-I活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.0131] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 254.5 \times (\Delta A + 0.0087) \div W \times D$$

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 μg 果糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SS-I活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.0131] \div V1 \div T \times D$$

$$= 254.5 \times (\Delta A + 0.0087) \times D$$

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 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, 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	10	
蒸馏水	40	50
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 200μL 至 96 孔板中，540nm 下测定吸光值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		