

蔗糖合成酶（合成方向；SS-II）试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：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。研究其合成方向 SS-II 的活性对于植物蔗糖合成具有重要意义。

测定原理：

SS-II 催化游离果糖与葡萄糖供体 UDPG 反应生成蔗糖，蔗糖与间苯二酚反应可呈现颜色变化，在 480nm 下有特征吸收峰，酶活力大小与颜色的深浅成正比。

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℃ 保存；
试剂一：液体 2.5mL×1 瓶，-20℃ 保存；
试剂二：1000μg/mL 蔗糖溶液 10mL×1 瓶，4℃ 保存；
试剂三：液体 2mL×1 瓶，4℃ 保存
试剂四：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存；
试剂五：液体 6mL×1 瓶，4℃ 避光保存；

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℃ 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 480nm，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（μL）	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	10	10		
蒸馏水		45	45	55
试剂二			10	
试剂一	45			

混匀，25℃ 准确水浴 10min

试剂三	15	15	15	15
-----	----	----	----	----

沸水浴中煮沸 10min 左右（盖紧，以防止水分散失），冷却

试剂四	210	210	210	210
试剂五	60	60	60	60

混匀，沸水浴 30min，冷却后，取 200 μ L 至微量石英比色皿或 96 孔板中，480nm 下测定各管吸光值。
标准管和空白管只要做一管。每个测定管需要设一个对照管。

SS-II 活性计算：

1、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 μ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SS-II 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = \frac{C \text{ 标准管} \times V1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})} \div (V1 \times Cpr) \div T = 100 \times \frac{(A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})} \div Cpr$$

2、按照样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟催化产生 1 μ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SS-II 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \frac{C \text{ 标准管} \times V1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})} \div (W \times V1 \div V2) \div T = 100 \times \frac{(A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})} \div W$$

C 标准管：标准管浓度，1000 μ g/mL； V1：加入反应体系中样本体积，0.01mL； V2：加入提取液体积，1mL； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本鲜重，g； T：反应时间：10min。