

蔗糖合成酶（合成方向；SS-II）试剂盒说明书

微量法 100管/48样

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。

自备仪器和样品：

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°C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。

蔗糖合成酶（合成方向；SS-II）试剂盒说明书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。

SS-II活性(μ g/min/mg prot) = $C_{\text{标准管}} \times V_1 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T = 100 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$

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。

SS-II活性(μ g/min/g鲜重) = $C_{\text{标准管}} \times V_1 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div (W \times V_1 \div V_2) \div T = 100 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div W$

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。