

蔗糖合成酶（分解方向；SS- I）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。

测定原理：

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测定还原糖的含量来反映酶活性的高低。

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 10mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：粉剂×2 支，-20℃保存；临用前每支加入 1.2mL 试剂二充分溶解待用，现配现用；

试剂四：液体 6mL×1 瓶，4℃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 540nm，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
样本	10	10
试剂三	40	
试剂一		40
混匀，30℃准确水浴 30min 后，95℃水浴 10min		
试剂四	50	50

95℃水浴 5min 左右，冷却至室温

蒸馏水	400	400
-----	-----	-----

混匀，取 200 μ L 至微量石英比色皿或 96 孔板中，540nm 下测定各管吸光值。 $\Delta A = A$ 测定 - A 对照。每个测定管需要设一个对照管。

SS- I 活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0012x - 0.0492$ ；x 为标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)，y 为 ΔA 。

2、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 μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SS- I 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.0492) \div 0.0012 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 138.9 \times (\Delta A + 0.0492) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按照样本鲜重计算

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

$$\begin{aligned} \text{SS- I 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0492) \div 0.0012 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 138.9 \times (\Delta A + 0.0492) \div W \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，0.05mL； V 样：加入样本体积，0.01 mL； V 样总：加入提取液体积，1 mL；

T：反应时间，30 min； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0006x - 0.0492$ ；x 为标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)，y 为 ΔA 。

2、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 μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SS- I 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.0492) \div 0.0006 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 277.8 \times (\Delta A + 0.0492) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按照样本鲜重计算

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

$$\begin{aligned} \text{SS- I 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0492) \div 0.0006 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 277.8 \times (\Delta A + 0.0492) \div W \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，0.05mL； V 样：加入样本体积，0.01 mL； V 样总：加入提取液体积，1 mL；

T：反应时间，30 min； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g。