

蔗糖合成酶（分解方向；SS- I）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 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、水浴锅、离心机、移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰

试剂的组成和配制：

提取液：液体 60mL×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	20	20
试剂三	80	
试剂一		80

混匀，30℃准确水浴 30min 后，95℃水浴 10min，冷却至室温

试剂四	100	100
-----	-----	-----

95℃水浴 5min 左右，冷却至室温

蒸馏水	800	800
-----	-----	-----

混匀，540nm 下测定各管吸光值。ΔA=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:

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 $1\mu\text{g}$ 还原糖定义为一个酶活力单位。

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

3、按照样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织每分钟催化产生 $1\mu\text{g}$ 还原糖定义为一个酶活力单位。

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

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.1mL ; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02mL ; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL ;

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