

蔗糖合成酶（合成方向；SS-II）检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 4mL×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 3mL×1 瓶，4℃ 保存

试剂四：液体 40mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂五：液体 12mL×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:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 | 标准管 | 空白管 |
|-----------|-----|-----|-----|-----|
| 样本 | 30 | 30 | | |
| 蒸馏水 | | 150 | 150 | 180 |
| 试剂二 | | | 30 | |
| 试剂一 | 150 | | | |

混匀, 25℃准确水浴 10min

| | | | | |
|-----|----|----|----|----|
| 试剂三 | 50 | 50 | 50 | 50 |
|-----|----|----|----|----|

沸水浴中煮沸 10min 左右 (盖紧, 以防止水分散失), 冷却

| | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| 试剂四 | 700 | 700 | 700 | 700 |
| 试剂五 | 200 | 200 | 200 | 200 |

混匀, 沸水浴 30min, 冷却后, 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 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

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

2、按照样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

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

C 标准管: 标准管浓度, 1000μg/mL;

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.03mL;

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。