

**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 (μg/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 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

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

$$= 138.9 \times (\Delta A + 0.0492) \div C_{\text{pr}}$$

- 3、按照样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟催化产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

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

$$= 138.9 \times (\Delta A + 0.0492) \div W$$

V 反总：反应体系总体积，0.1mL； V 样：加入样本体积，0.02 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。