**蔗糖合成酶（SS）活性检测试剂盒（微量法）**

**产品货号：**BA1530

**产品规格：**100管/48样

**产品简介：**

蔗糖是光合产物向“库”器官运输的主要形态。SS（EC 2.4.1.13）催化植物体内游离果糖和葡萄糖合成蔗糖。

SS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。

**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者 增加样本量进行检测。**

**试验中所需的仪器和试剂:**

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、离心机、移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、冰。

**产品组成：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 |
| 提取液 | 液体50mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂一 | 液体2.5mL×1瓶 | -20℃ |
| 试剂二 | 粉剂10mg×1支 | 2-8℃ |
| 试剂三 | 液体2mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂四 | 液体25mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂五 | 液体6mL×1瓶 | 2-8℃ |

溶液的配制：

试剂二：临用前加1mL水，配制成10mg/mL蔗糖溶液，再将其用蒸馏水稀释为500μg/mL备用。

**操作步骤 (仅供参考) ：**

1. **样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

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。

1. **测定步骤**
2. 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。
3. 样本测定（在1.5mL 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 |
| 试剂一 | 45 | - | - | - |
| 试剂二 | - | - | 10 | - |
| 混匀，25℃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，80℃水浴保温20min，冷却后，吸取200μL于微量玻璃比色皿或者96孔板中，在480nm下测定各管 吸光值（标准管和空白管只做1-2管，每个测定管需要设定一个对照管）。

计算ΔA测=A测定管-A对照管，ΔA标=A标准管-A空白管。

1. **SS活力单位的计算**
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蔗糖定义为一个酶活力单位。

SS活性(U/mg prot)=（C标准管×V1×ΔA测÷ΔA标）÷(V1×Cpr)÷T=50×ΔA测÷ΔA标÷Cpr

1. 按照样本质量计算

单位定义：每g组织每分钟催化产1µg蔗糖定义为一个酶活力单位。

SS活性(U/g质量)=（C标准管×V1×ΔA测÷ΔA标）÷(W×V1÷V2)÷T=50×ΔA测÷ΔA标÷W

C标准管：标准管浓度，500µg/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

**注意事项：**

尽量在30min内完成测定。