

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K1207-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(470 - 490 nm)

Elabscience®蔗糖合成酶 (SS-II) (合成方向) 比色法测试盒

Sucrose Synthase-II (SS-II) Activity Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测植物组织样本中蔗糖合成酶 (SS-II) (合成方向) 的酶活。

检测原理

蔗糖合成酶 (Sucrose synthase-II, SS-II) (合成方向) 催化底物反应生成蔗糖, 蔗糖与显色剂反应生成显色物质, 在 480 nm 下有特征吸收峰, 酶活力大小与颜色的深浅成正比。

本试剂盒检测植物组织样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用考马斯亮蓝法(货号: E-BC-K168-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	60 mL × 1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	反应液 A (Reaction Solution A)	9 mL × 1 瓶	-20°C 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	反应液 B (Reaction Solution B)	11 mL × 1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	反应液 C (Reaction Solution C)	33 mL × 2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 (Chromogenic Agent)	14 mL × 1 瓶	-20°C 避光保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	标准品 (Standard)	粉剂 × 2 支	-20°C 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(470-490 nm, 最佳检测波长 480 nm)、匀浆机、恒温水浴锅、恒温箱、离心机

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25°C。

② 10 mg/mL标准品的配制：

取一支试剂六，加入1 mL试剂一溶解即可得10 mg/mL标准品，未用完的试剂可2-8°C保存1周。

③ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mg/mL)	0	0.25	0.5	1	2	3	4	5
10 mg/mL 标准品(μ L)	0	10	20	40	80	120	160	200
试剂一(μ L)	400	390	380	360	320	280	240	200

样本准备

① 样本处理

植物组织样本：按照样本质量(g)：试剂一体积(mL) = 1:19的比例(如称取0.05 g的组织样本，加入0.95 mL的试剂一)向样本中加入试剂一进行匀浆，匀浆后，4°C，10000 ×g，离心10 min，取上清液待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

对照样本：取0.3 mL待测上清液于新的EP管中，沸水浴5 min，流水冷却，作为对照样本。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的检测范围：110 - 4000 U/g wet weight，不同样本的稀释如下表(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
5%玉米匀浆	1-5	5%红薯匀浆	1-5
5%土豆匀浆	不稀释	5%绿萝匀浆	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

- ① 配制 10 mg/mL 标准品溶液时应确保试剂六中粉末完全溶解。
- ② 试剂五易挥发，储存过程中注意将瓶盖拧紧。

操作步骤

对照样本处理:取 0.3 mL 待测上清液于新的 EP 管中,沸水浴 5 min,流水冷却,作对照样本。

- ① **标准管:**取 40 μL 不同浓度的标准品溶液,分别加入相应的 EP 管中。
测定管:取 40 μL 待测样本加入相应的 EP 管中。
对照管:取 40 μL 对照样本相应的 EP 管中。
- ② 向步骤①中标准管加入 80 μL 超纯水。
向步骤①中测定管、对照管中加入 80 μL 试剂二。
- ③ 充分混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min。
- ④ 向步骤③中各管加入 100 μL 试剂三。
- ⑤ 充分混匀, 沸水浴 10 min, 流水冷却。
- ⑥ 向步骤⑤中各管加入加入 600 μL 试剂四和 120 μL 试剂五。
- ⑦ 充分混匀, 沸水浴 10 min, 流水冷却, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10000 $\times\text{g}$ 离心 10 min。
- ⑧ 取 300 μL 上清于酶标板中, 酶标仪 480 nm 波长下检测各孔吸光度。

计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

操作表

	标准管	测定管	对照管
不同浓度的标准品溶液(μL)	40	--	--
待测样本(μL)	--	40	--
对照样本(μL)	--	--	40
试剂二(μL)	--	80	80
超纯水(μL)	80	--	--
充分混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min。			
试剂三(μL)	100	100	100
充分混匀, 沸水浴 10 min, 流水冷却。			
试剂四(μL)	600	600	600
试剂五(μL)	120	120	120
充分混匀, 沸水浴 10 min, 流水冷却, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10000 $\times\text{g}$ 离心 10 min, 取 300 μL 上清于酶标板中, 酶标仪 480 nm 波长下检测, 测定各孔吸光度。计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。			

本试剂盒检测植物组织样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用考马斯亮蓝法(货号: E-BC-K168-M)。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

植物组织样本中蔗糖合成酶 (SS-II) 酶活计算公式:

① 按样本蛋白浓度计算:

定义: 37°C 条件下, 每毫克植物组织蛋白每分钟催化产生 1 μg 蔗糖所需要酶活为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{SS-II 活性} &= \frac{\Delta A - b}{a} \times V_1 \times 10^3 \div T \div (\text{Cpr} \times V_1) \times f \\ (\text{U/mgprot}) &= 50 \times \frac{\Delta A - b}{a} \div \text{Cpr} \times f\end{aligned}$$

② 按照样本鲜重计算:

定义: 37°C 条件下, 每克植物组织每分钟催化产生 1 μg 蔗糖所需要酶活为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{SS-II 活性} &= \frac{\Delta A - b}{a} \times V_1 \times 10^3 \div T \div (V_1 \div V_2 \times m) \times f \\ (\text{U/g wet weight}) &= \frac{\Delta A - b}{a} \times 50 \div m \times V_2 \times f\end{aligned}$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA : 测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

V_1 : 加入样本体积, 0.04 mL

V_2 : 加入试剂一的体积, mL

T: 反应时间, 20 min

Cpr: 样本蛋白质浓度, mgprot/mL

m: 样本质量, g

10^3 : 1 mg = 10^3 μg

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

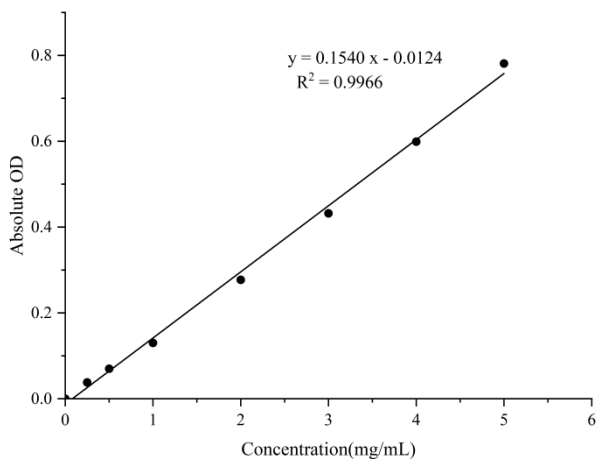
检测范围	110 - 4000 U/g wet weight	批间差	2.0-3.5%
灵敏度	30 U/g wet weight	批内差	1.5-2.0%

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量40 μ L, 按照操作步骤进行实验, OD值如下表所示:

标准品浓度(mg/mL)	0	0.25	0.5	1	2	3	4	5
OD 值	0.051	0.090	0.123	0.177	0.324	0.476	0.638	0.826
	0.048	0.084	0.116	0.181	0.328	0.486	0.658	0.835
平均 OD 值	0.050	0.087	0.120	0.179	0.326	0.481	0.648	0.831
绝对 OD 值	0.000	0.038	0.070	0.130	0.277	0.432	0.599	0.781

② 绘制标曲(如下图):



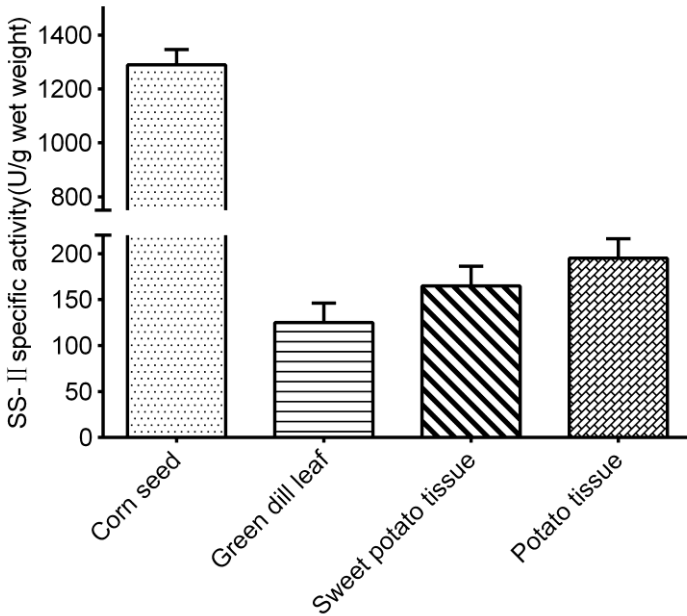
附录2 实例分析

例如检测玉米组织(数据仅供参考):

取5%玉米种子上清液40 μL ，按操作表操作，结果如下：标准曲线： $y = 0.154x - 0.0124$ ，对照孔平均OD值为1.227，测定孔平均OD值为1.448，计算结果为：

$$\begin{aligned} \text{SS-II 活力(U/g wet weight)} &= (1.448 - 1.227 + 0.0124) \div 0.154 \times 50 \div 0.05 \times 0.95 \\ &= 1439.80 \text{ U/g wet weight} \end{aligned}$$

按说明书操作，测定玉米种子上清液(不稀释，加样量40 μL)、绿萝组织上清液(不稀释，加样量40 μL)、红薯组织上清液(不稀释，加样量40 μL)、土豆组织上清液(不稀释，加样量为40 μL)中的蔗糖合成酶酶活(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数,重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本,重新检测
样本测量结果过大	样本浓度太高	选择合适稀释倍数,重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

