

蔗糖磷酸合成酶 (Sucrose phosphate synthase, SPS) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：正式测定管前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

蔗糖不仅是重要的光合产物，也是植物体内运输的主要物质，还是碳水化合物的贮存形式之一。SPS (EC 2.4.1.14) 以果糖-6-磷酸为受体，形成的蔗糖磷酸在蔗糖磷酸酶的作用下形成蔗糖。一般把蔗糖磷酸酯合成酶-蔗糖磷酸酶系统看作是蔗糖合成的主要途径。

测定原理：

蔗糖磷酸合成酶催化果糖-6-磷酸形成蔗糖磷酸，蔗糖磷酸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。

需自备的的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、离心机、移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰

试剂的组成和配制：

- 提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；
试剂一：液体 2.5mL×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 2mL×1 瓶，4℃ 保存
试剂四：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存；
试剂五：液体 6mL×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：

- 1、 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。
- 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 | 标准管 | 空白管 |
|-----------|-----|-----|-----|-----|
| 样本 | 10 | 10 | | |
| 蒸馏水 | | 45 | 45 | 55 |
| 试剂二 | | | 10 | |
| 试剂一 | 45 | | | |

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, 沸水浴 30min, 冷却后, 取 200 μ L 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 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。

SPS 活力单位的计算:

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 1 μ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

SPS 活性(μ g /min/mg prot)= C 标准管 \times V1 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div (V1 \times Cpr) \div T=100 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div Cpr

2、按照样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1 μ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

SPS 活性(μ g /min/g 鲜重)= C 标准管 \times V1 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div (W \times V1 \div V2) \div T=100 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div W

C 标准管: 标准管浓度, 1000 μ g/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。