

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。