

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 200μL 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 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

SPS 活性(μg /min/mg prot)= C 标准管×V1× (A 测定管-A 对照管)÷ (A 标准管-A 空白管)÷(V1×Cpr)÷T=100× (A 测定管-A 对照管)÷ (A 标准管-A 空白管)÷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 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

SPS 活性(μg /min/g 鲜重) = C 标准管×V1× (A 测定管-A 对照管)÷ (A 标准管-A 空白管)÷(W×V1÷V2)÷T=100× (A 测定管-A 对照管)÷ (A 标准管-A 空白管)÷W

C 标准管：标准管浓度，1000μg/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。