

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

微量法 100 管/48 样

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℃ 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) $\div$ (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 $\mu$ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

SPS 活性( $\mu$ 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 $\mu$ 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。