

## 蔗糖磷酸合成酶（SPS）检测试剂盒（微量法）

**注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**

### 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。

### 试剂组成和配制：

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<br>(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 $\mu$ 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 $\mu$ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SPS 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = \frac{C \text{ 标准管} \times V1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (V1 \times Cpr)} \div T$$

$$= 100 \times \frac{(A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})} \div Cpr$$

### 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。

$$\text{SPS 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \frac{C \text{ 标准管} \times V1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (W \times V1 \div V2)} \div T$$

$$= 100 \times \frac{(A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})} \div W$$

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。