

蔗糖磷酸合成酶（SPS）检测试剂盒（分光光度法）

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 60mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 4mL×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 3mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂四：液体 40mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂五：液体 12mL×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:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	30	30		
蒸馏水		150	150	180
试剂二			30	
试剂一	150			

混匀, 25°C准确水浴 10min

试剂三	50	50	50	50
-----	----	----	----	----

沸水浴中煮沸 10min 左右 (盖紧, 以防止水分散失), 冷却

试剂四	700	700	700	700
试剂五	200	200	200	200

混匀, 沸水浴 30min, 冷却后, 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。

$$\begin{aligned} \text{SPS 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= C \text{ 标准管} \times V1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 100 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{SPS 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= C \text{ 标准管} \times V1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 100 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

C 标准管: 标准管浓度, 1000μg/mL;

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.03mL;

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。