

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

（微板法 48 样）

一、产品简介：

蔗糖磷酸合成酶（EC 2.4.1.14）主要存在细胞质内，参与植物的生长发育，是植物体内催化蔗糖合成的关键酶之一。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生成有色物质，在 480nm 下有特征吸收峰，酶活力大小与颜色的深浅成正比。

二、测试盒组成和配制：

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|--------------|---------|--|
| 提取液 | 液体 60mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 试剂一 | 液体 2.1mL×1 支 | -20℃ 保存 | |
| 试剂二 | 液体 1 mL×1 支 | 4℃ 保存 | |
| 试剂三 | 液体 20mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 试剂四 | 粉剂 mg×2 支 | 4℃ 保存 | 临用前甩几下使粉剂落入底部，每支加入 4mL 蒸馏水充分溶解，现配现用，一周内用完。 |
| 标准品 | 粉剂 mg×1 支 | 4℃ 保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂 |

三、所需仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵、蒸馏水。

四、蔗糖磷酸合成酶（SPS）的测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称样本 0.1g（水分充足的样本可取 0.5g）于研钵中，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆。12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注意】 若样本含糖量高，可引起 A 对照值较大如超过 1.6，即检测背景值过高会影响检测，可在样本制备过程中增加除糖步骤：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆，4℃ 放置 10min；12000rpm，4℃ 离心 5min；弃上清，留沉淀，向沉淀中加入经预冷的 80%乙醇混匀，4℃ 放置 5min；12000rpm，4℃ 离心 5min；弃上清，留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液涡旋混匀，4℃ 放置 10min；12000rpm，4℃ 离心 10min；留上清，弃沉淀。上清液置冰上待测。

② 液体样本：直接测定。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 480nm。

② 在 EP 管中依次加入：

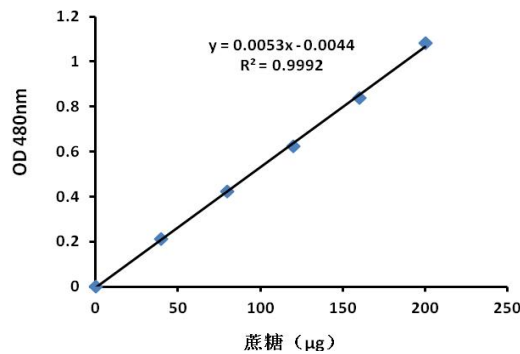
| 试剂名称（ μL ） | 测定管 | 对照管 |
|---------------------------------|-----|-----|
| 试剂一 | 40 | |
| 蒸馏水 | | 40 |
| 样本 | 20 | 20 |
| 37℃ 水浴 20min | | |
| 试剂二 | 10 | 10 |
| 试剂二需直接加到反应液里面，且务必混匀（可用枪头吸打），95℃ | | |

| | | |
|--|-----|-----|
| 水浴中煮沸 10min (可用封口膜缠紧, 防止水分散失), 冷却至室温。 | | |
| 试剂三 | 200 | 200 |
| 试剂四 | 60 | 60 |
| 混匀, 95°C水浴 20min, 冷却后, 取 200μL 至 96 孔板中, 480nm 下读取吸光值 A。ΔA=A 测定-A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。 | | |

【注】: 若ΔA 值过小如在零附近徘徊, 可延长 37°C水浴时间 T (如 40min 或更长) 或增加样本取样量 W (如增至 0.2g), 或者增加样本的加样体积 V1 (如 40μL, 则试剂三相应减少), 相应的变量重新代入计算公式计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0053x - 0.0044$; x 是标准品质量 (μg), y 是ΔA。



2、按照蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SPS 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0044) \div 0.0053] \div (V1 \times Cpr) \div T$$

$$= 471.7 \times (\Delta A + 0.0044) \div Cpr$$

3、按照样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每分钟催化产生 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SPS 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0044) \div 0.0053] \div (V1 \div V \times W) \div T$$

$$= 471.7 \times (\Delta A + 0.0044) \div W$$

4、按照液体体积计算:

单位定义: 每毫升液体每分钟催化产生 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SPS 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0044) \div 0.0053] \div V \div T$$

$$= 471.7 \times (\Delta A + 0.0044) \div W$$

V1---加入反应体系中样本体积, 0.02mL; V---加入提取液体积, 1mL;

W---样本鲜重, g;

T---反应时间, 20min;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (10mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20°C保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 2, 4, 6, 8, 10. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照: 20μL 标准品+40μL 蒸馏水+10μL 试剂二+200μL 试剂三+60μL 试剂四, 依次加样操作, 95°C水浴 20min, 冷却后, 取 200μL 至 96 孔板中, 480nm 下测定, 根据结果即可制作标准曲线。