

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

(分光法 24 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、试剂盒组成和配制:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|--------------|---------|---|
| 提取液 | 液体 30mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 液体 2.1mL×1 支 | -20°C保存 | |
| 试剂二 | 液体 1mL×1 支 | 4°C保存 | |
| 试剂三 | 液体 20mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂四 | 粉剂 mg×2 瓶 | 4°C保存 | 临用前甩几下使粉剂落入底部, 每瓶加入 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°C保存 | 若重新做标曲, 则用到该试剂 |

三、所需仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、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°C离心 10min, 取上清液, 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°C放置 10min; 12000rpm, 4°C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°C放置 5min; 12000rpm, 4°C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°C放置 10min; 12000rpm, 4°C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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 480nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|--------------|-----|-----|
| 试剂一 | 80 | |
| 蒸馏水 | | 80 |
| 样本 | 40 | 40 |
| 37°C水浴 20min | | |
| 试剂二 | 20 | 20 |

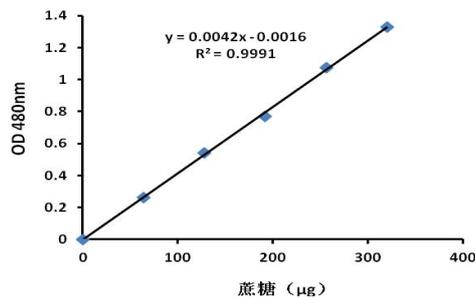
试剂二需直接加到反应液里面，且务必混匀（可用枪头吸打），95°C水浴中煮沸 10min（可用封口膜缠紧，防止水分散失），冷却至室温。

| | | |
|--|-----|-----|
| 试剂三 | 400 | 400 |
| 试剂四 | 120 | 120 |
| 混匀，95°C水浴 20min，冷却后液体全部转入 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，480nm 下读取吸光值 A。 $\Delta A=A$ 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 80 μ L，则试剂三相应减少），相应的变量重新代入计算公式计算。

五、计算公式：

1、标准曲线方程： $y = 0.0042x - 0.0016$ ；x 是标准品质量（ μ g），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 1 μ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SPS 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0016) \div 0.0042] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 297.6 \times (\Delta A + 0.0016) \div \text{Cpr}$$

3、按照样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟催化产生 1 μ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SPS 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0016) \div 0.0042] \div (V1 \div V \times W) \div T$$

$$= 297.6 \times (\Delta A + 0.0016) \div W$$

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 1 μ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{SPS 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0016) \div 0.0042] \div V1 \div T$$

$$= 297.6 \times (\Delta A + 0.0016)$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.04mL；

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, 1.6, 3.2, 4.8, 6.4, 8. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照：40 μ L 标准品+80 μ L 蒸馏水+20 μ L 试剂二+400 μ L 试剂三+120 μ L 试剂四，依次加样操作，95°C水浴 20min，冷却后液体转入 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，480nm 下测定，根据结果即可制作标准曲线。