

蔗糖磷酸合成酶 (SPS) 测试盒说明书 (精简版)

(货号: A098-1-1 微板法 48T)

一、测定原理:

SPS 催化果糖-6-磷酸形成蔗糖磷酸,再用蔗糖磷酸与间苯二酚反应生成的物质在 480nm 处测定吸光值来测定其含量,从而可以计算 SPS 的活性。

二、检测意义:

蔗糖磷酸合成酶 (Sucrose Phosphate Synthase, SPS) 主要在绿色光合器官中进行蔗糖合成,在贮藏器官中蔗糖磷酸合成酶活性则很低。但有实验证明,在蔗糖源池的蔗糖流通中,包含着一个无效的循环,即蔗糖同时合成与分解,此时蔗糖磷酸合成酶活性很强。因此蔗糖磷酸合成酶在库组织中的作用不可低估,在光合与非光合组织中蔗糖磷酸合成酶活性被代谢产物与可逆的蛋白质磷酸化所调节。

三、试剂组成及配制:

试剂	规格	保存
提取液	30mL×1瓶	4℃保存
试剂一	液体2.1mL×1支	-20℃以下保存
试剂二	液体1mL×1支	4℃保存
试剂三	液体20mL×1瓶	4℃保存
试剂四	粉剂×2支	4℃保存
试剂四应用液配制:临用前取一支粉剂中加入 4mL 蒸馏水,溶解后备用,一周内用完		
标准品	粉剂×1支	4℃保存

四、所需仪器耗材及试剂:

含 480nm 波长的酶标仪及 96 孔板(附送一块)、37℃ 水浴锅或恒温箱、沸水浴锅、台式低速离心机、各种规格移液器、蒸馏水、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂(本公司有售)。

五、样本前处理:

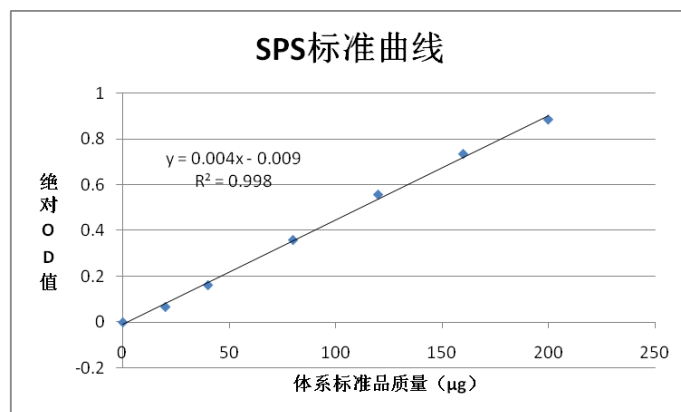
- 组织样本:将植物组织用生理盐水漂洗干净,滤纸吸干,准确称重,按重量(g):体积(ml)=1:9 的比例(水分含量多的样本可用 1:2 的比例)加入提取液,冰水浴条件下匀浆制成 10%的匀浆液,4000 转/分,离心 10 分钟,取上清待测。(如需测蛋白浓度,蛋白定量试剂盒本所有售)
- 液体样本:直接测定。如有浑浊,4000 转/分离心 2 分钟后取上清液待测。

六、操作步骤: (在离心管中操作)

	测定管	对照管
蒸馏水 (μL)		40
样本 (μL)	20	20
试剂一 (μL)	40	
混匀, 37℃水浴 20min		
试剂二 (μL)	10	10
混匀, 95℃水浴 10min, 取出流水冷却		
试剂三 (μL)	200	200
试剂四应用液(μL)	60	60
混匀, 95℃水浴 20min 后, 取出流水冷却, 吸取 200μL 反应液到 96 孔板中(注意不要吸入气泡), 480nm 处, 酶标仪读取各孔 OD 值, ΔA=A 测定-A 对照		

七、计算公式:

- 标准曲线:**(往标准品粉剂中加入 1mL 蒸馏水,配成 10mg/mL 标准液,再用蒸馏水稀释成 1、2、4、6、8、10mg/mL 浓度,按照 20μL 标准品+40μL 蒸馏水+10μL 试剂二+200μL 试剂三+60μL 试剂四应用液依次加样,混匀 95℃水浴 20min,流水冷却,取 200μL 反应液 480nm 处酶标仪读数)



2、按蛋白浓度计算:

单位定义:每毫克组织蛋白每分钟转化底物生成 1μg 蔗糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{SPS活性} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mgprot}) = \frac{\Delta A + 0.009}{0.004} \div T \div \text{Cpr} \times V_{\text{样}}$$

T:反应时间, 20min;

Cpr:组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白);

V_样: 样本加入量, 0.02mL。

3、按样本鲜重计算:

单位定义:每克组织每分钟转化底物生成 1μg 果糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{SPS活性} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g鲜重}) = \frac{\Delta A + 0.009}{0.004} \div T \div \left(\frac{W}{V_{\text{样总}}} \times V_{\text{样}} \right)$$

T:反应时间, 20min;

W: 样本质量, g;

V_{样总}: 前处理时加的提取液的总体积, mL;

V_样: 样本加入量, 0.02mL。

八、注意事项:

- 测试前尽量选 1-2 个样本做预试,以确定样本适宜浓度及实验流程;
- 制备样本上清时可按实际情况制备所需样本浓度,提取液加入比例可按 1: 5~10 进行;
- 如果自己制备标准曲线,则所测样本数降低;如果不做标准曲线,可按公式直接计算;
- 样本蛋白浓度可用本公司的 A045 系列 (BCA 法或考马斯亮蓝法) 进行测定;
- 若 ΔA 偏小 (或在零附近徘徊),可增加样本加样体积 (如 30μL, 则加入试剂三体积相应减少),或提高样本浓度 (如 0.2g 加 1mL 提取液提取),或延长 37℃ 反应时间 (如 40min, 计算时相应的变量代入计算公式计算);
- 如样本 ΔA 值大于 0.6, 则需将样本上清稀释以后进行测定;
- 95℃水浴时,可将离心管口缝隙用封口膜封紧后进行;
- 每个样本都需设定一个对照管。