

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

(货号: G0515W96 微板法 96 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 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 4.5mL×1 瓶	-20°C保存	
试剂二	液体 2.5mL×1 支	4°C保存	
试剂三	液体 40mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉剂 mg×4 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:

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°C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°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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 480nm。

② 试剂一解冻至室温, 或于 37°C条件下孵育 15min 左右, 在 EP 管中依次加入:

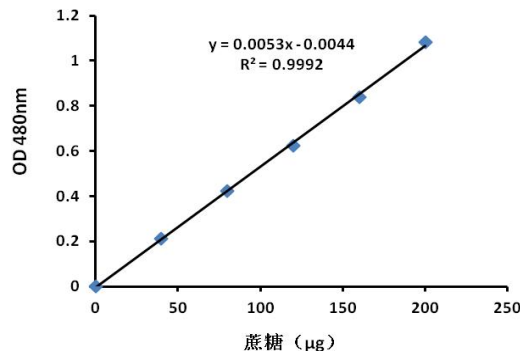
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	40	
蒸馏水		40
样本	20	20
37°C水浴 20min		
试剂二	10	10
试剂二需直接加到反应液里面, 且务必混匀 (可用枪头吸打), 95°C		

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	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。