

可溶性淀粉合成酶 (Soluble starch synthase, SSS)

试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

SSS (EC 2.4.1.21) 通常以游离态存在于质体基质中, 催化淀粉链延长, 主要负责支链淀粉的合成。

测定原理:

SSS 催化 ADPG 与淀粉引物(葡聚糖)反应, 将葡萄糖分子转移到淀粉引物上, 同时生成 ADP, 在反应体系中添加的丙酮酸激酶、己糖激酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶依次催化 NADP⁺还原为 NADPH, NADPH 生成量与前一步反应中 ADP 生成量呈正比, 340nm 下测定 NADPH 增加量即可计算 SSS 活性。

组成:

产品名称	SA006-100T/96S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	40ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂四: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂五: 液体	1 瓶	-20°C
试剂六: 粉剂	1 瓶	-20°C
说明书	一份	

试剂二临用前加入 14ml 试剂一充分混匀备用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;
试剂三临用前加入 8ml 试剂一充分混匀备用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;
试剂四临用前加入 10ml 试剂一充分混匀备用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;
试剂五临用前加入 0.5ml 蒸馏水, 充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;
试剂六临用前加入 0.5ml 蒸馏水, 充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;

自备仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液制备:

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



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。10000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、在 EP 管中按顺序加入下列试剂

试剂名称 (μl)	测定管
样本	75
试剂二	135

混匀, 30℃保温 20 min, 置沸水浴中 1 min (盖紧, 防止水分散失), 冰浴冷却

试剂三	75
-----	----

混匀, 30℃保温 30 min, 置沸水浴中 1 min (盖紧, 防止水分散失), 冰浴冷却, 10000g 4℃离心 10min, 取上清液 (如果一次性测定样本较多, 可将试剂四、五和六按比例配成混合液)

上清液	150
试剂四	100
试剂五	5
试剂六	5

混匀后立即 340 nm 波长下记录初始吸光度 A1 和 2min 后的吸光度 A2, 计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

注意: 试剂二如有沉淀, 加入之前要使之充分溶解混匀。

SSS 活性计算:

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

1、按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{SSS (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times \text{稀释倍数}$$

$$= 529 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

2、按照样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{SSS 活性 (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times \text{稀释倍数}$$

$$= 529 \times \Delta A \div W$$

V 反总: 反应体系总体积, 2.6×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol /cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.075 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 2 min; 稀释倍数: 1.9; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下:

1、按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{SSS (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times \text{稀释倍数}$$

$$= 1059 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。



2、按照样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

SSS 活性 (nmol/min/g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times \text{稀释倍数} = 1059 \times \Delta A \div W$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2.6×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d : 96 孔板光径, 0.5cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.075 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 2 min; 稀释倍数: 1.9; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量。

