

可溶性淀粉合成酶(SSS)活性检测试剂盒说明书

Isocitrate Dehydrogenase Activity Assay Kit

分光光度法

货号: AK282

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES36	60mL×1 瓶	4℃保存;
液体一	7mL×2 瓶	4℃保存;
液体二	4mL×2 瓶	4℃保存;
液体三	8mL×2 瓶	4℃保存;
粉剂一	55.5mL×1 瓶	4℃保存;
粉剂二	粉剂×1 支	4℃保存;
粉剂三	粉剂×1 支	-20℃保存;
粉剂四	粉剂×1 支	4℃保存;
粉剂五	粉剂×1 支	4℃保存;
粉剂六	粉剂×1 支	-20℃保存;
粉剂七	粉剂×1 支	-20℃保存;
粉剂八	粉剂×1 支	4℃保存;
粉剂九	粉剂×1 支	4℃保存;
粉剂十	粉剂×1 支	-20℃保存;
AK282-A	液体×1 支	-20℃保存; 临用前加入 500μL 蒸馏水, 充分溶解备用, 用不完的试剂 4℃保存;
AK282-B	粉剂×1 支	-20℃保存; 临用前加入 500μL 蒸馏水, 充分溶解备用, 用不完的试剂 4℃保存;
反应液 I 配制	临用前依次把粉剂一、粉剂二和粉剂三转移到一瓶液体一中混合溶解。这样可以分两批配制并且测定。	
反应液 II 配制	临用前依次把粉剂四、粉剂五、粉剂六和粉剂七转移到一瓶液体二中混合溶解。这样可以分两批配制并且测定。	
反应液 III 配制	临用前依次把粉剂八、粉剂九和粉剂十转移到一瓶液体三中混合溶解。这样可以分两批配制并且测定。	

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 可溶性淀粉合成酶 (Soluble starch synthase, 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。可溶性淀粉合成酶 (SSS) 是参与淀粉合成的最重要酶类之一。

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 生成量成正比, 340nm 下测定 NADPH 增加量即可计算 SSS 活性。

自备用品:

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液制备

1. 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 ES36), 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	测定管 (μL)
样本	150
反应液 I	270
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,	
反应液 II	150
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 25℃离心 10min, 取上清液。	
上清液	450
反应液 III	300
AK282-A	10
AK282-B	10
混匀后立即在 340 nm 波长下记录初始吸光度 A1 和 2min 后的吸光度 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

注意: 反应液 I 如有沉淀, 加入之前要使之充分溶解混匀。

SSS 活力单位的计算:

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。

$$\text{SSS (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times \text{稀释倍数} = 522 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{SSS 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times \text{稀释倍数} \\ = 522 \times \Delta A \div W$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 5.7×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.15 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: 1.71; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量。