

可溶性淀粉合成酶（SSS）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHD3-C24	植物可溶性淀粉合成酶（SSS）试剂盒	24T	常量法
PMHD3-C48		48T	常量法

产品说明：

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。

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。

试剂组成：

试剂名称	25T 规格	50T 规格	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 10mL×1 瓶	液体 16 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二A	粉剂×1瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存
试剂二B	粉剂×1支	粉剂×2 支	-20℃ 保存
试剂二C	粉剂×1支	粉剂×2 支	-20℃ 保存
试剂三A	液体 5mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三B	粉剂×1支	粉剂×2 瓶	-20℃ 保存
试剂四	液体 16μL×1 支	液体 30μL×1 支	2-8℃ 保存
试剂五A	液体 8mL×1 瓶	液体 18mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂五B	粉剂×1瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存
试剂五C	粉剂×1支	粉剂×2 支	2-8℃ 保存
试剂六	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20℃ 保存
试剂七	粉剂×1支	粉剂×1支	-20℃ 保存

24T 溶液的配制：

- 试剂二：**临用前取 1 瓶试剂二A 加入 8mL 试剂一，缓慢加热，逐渐升温至煮沸使其溶解，冷却后加入试剂二B 和试剂二C 混合溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融。
- 试剂三：**临用前试剂三B 加入试剂三A 溶解备用，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融。
- 试剂四：**临用前先离心，取 7 μL 试剂四加入 2.24 mL 溶解好的试剂三混合备用（约 14T），现用现配，也可根据样本量按比例配制。

- 4、**试剂五**：临用前取试剂五B 和试剂五C 加入试剂五A 溶解备用，用不完的试剂-20℃分装保存4 周，避免反复冻融。
- 5、**试剂六**：临用前取 1 支加入208 μL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂-20℃分装保存2 周，避免反复冻融。
- 6、**试剂七**：临用前加入2mL 蒸馏水，用不完的试剂-20℃分装保存8 周，避免反复冻融。

48T 溶液的配制：

- 1、**试剂二**：临用前取 1 瓶试剂二A 加入 8 mL 试剂一，缓慢加热，逐渐升温至煮沸使其溶解，冷却后加入 1 支试剂二B 和 1 支试剂二C 混合溶解，这样可以分两批配制并且测定，用不完的试剂-20℃分装保存2 周，避免反复冻融。
- 2、**试剂三**：临用前取 1 瓶试剂三B 加入 5mL 试剂三A 溶解备用，用不完的试剂-20℃分装保存4 周，避免反复冻融。
- 3、**试剂四**：临用前先离心，取 13 μL 试剂四加入4.16 mL 溶解好的试剂三混合备用（约27T），现用现配，也可根据样本量按比例配制。
- 4、**试剂五**：临用前取 1 瓶试剂五B 加入 8mL 试剂五A 和 1 支试剂五C 溶解备用，用不完的试剂-20℃分装保存4 周，避免反复冻融。
- 5、**试剂六**：临用前取 1 支加入208 μL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂-20℃分装保存2 周，避免反复冻融。
- 6、**试剂七**：临用前加入2mL 蒸馏水，用不完的试剂-20℃分装保存8 周，避免反复冻融。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

粗酶液制备：称取约 0.1g 组织加入 1mL 提取液，冰浴中匀浆。10000g，4℃离心 10 分钟，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定：在EP管内按顺序加入

试剂名称(μL)	测定管
样本	200
试剂二	270
混匀，30℃保温20min，置沸水浴中 1min（盖紧，防止水分散失），冰浴冷却。	
试剂四	150
混匀，30℃保温30min，置沸水浴中 1min（盖紧，防止水分散失），冰浴冷却，10000g 常温离心 10min，取上清液。37℃预热试剂五和上清液。	
上清液	450
试剂五	300

试剂六	15
试剂七	15

混匀后立即在 340nm 波长下记录初始吸光度 A_1 和 2min 后的吸光度 A_2 , 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。

三、SSS 活性计算

1、按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{SSS 活性 (U/mg prot)} = \frac{[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}]}{(C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{反总}} \times V_{\text{上清}}) \div T} = 43.2 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行测定粗酶液蛋白质浓度。

2、按照样本质量计算:

单位的定义: 每g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{SSS 活性 (U/g 质量)} = \frac{[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}]}{(W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{反总}} \times V_{\text{上清}}) \div T} = 43.2 \times \Delta A \div W$$

$V_{\text{测}}$: 测量体积, 0.78mL; $V_{\text{反总}}$: 反应体积, 0.62mL; $V_{\text{提取}}$: 加入提取液体积, 1mL;
 T : 反应时间, 20min; ϵ : NADPH 消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$; d : 石英比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样本}}$: 加入样本的量, 0.2mL; $V_{\text{上清}}$: 吸取上清液的量, 0.45mL; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; W : 样本质量, g。