

## 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
PMHD2-M96	植物可溶性淀粉合成酶（SSS）试剂盒	96T	微量法

### 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<sup>+</sup>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	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 16 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二A	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂二B	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂二C	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三A	液体 12mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三B	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂四	液体27μL×1 支	2-8℃保存
试剂五A	液体 18mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五B	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂五C	粉剂×2 支	2-8℃保存
试剂六	粉剂×3支	-20℃保存
试剂七	粉剂×1支	-20℃保存

### 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 12.5 μL 试剂四加入 4 mL 溶解好的试剂三混合备用（约53T），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 10min，取上清，置冰上待测。

#### 二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。

2. 样本测定：在 EP 管内按顺序加入

试剂名称 (μL)	测定管
样本	100
试剂二	135
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	75
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	150
试剂五	100
试剂六	5
试剂七	5

混匀后立即取出 200μL 于微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中在 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

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

---

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

V<sub>测</sub>: 测量体积, 0.26mL; V<sub>样</sub>: 加入样本体积, 0.1mL; V<sub>反总</sub>: 反应体积, 0.31mL; V<sub>上清</sub>: 加入上清液体积, 0.15mL; V<sub>提取</sub>: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 20min;  $\epsilon$ : 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; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。

**b.使用96孔UV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。

$$\text{SSS 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (Cpr \times V_{\text{样}} \div V_{\text{反总}} \times V_{\text{上清}}) \div T = 72 \times \Delta A \div Cpr$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

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。

$$\text{SSS 活性 (U/g 质量)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{反总}} \times V_{\text{上清}}) \div T = 72 \times \Delta A \div W$$

V<sub>测</sub>: 测量体积, 0.26mL; V<sub>样</sub>: 加入样本体积, 0.1mL; V<sub>反总</sub>: 反应体积, 0.31mL; V<sub>上清</sub>: 加入上清液体积, 0.15mL; V<sub>提取</sub>: 加入提取液体积, 1mL;  $\epsilon$ : NADPH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ mL}/\text{nmol}/\text{cm}$ ; d: 96孔板光径, 0.6cm; T: 反应时间, 20min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。