

## 可溶性淀粉合成酶 (Soluble starch synthase, SSS) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-DF006-100 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

### 一、产品简介:

可溶性淀粉合成酶 (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, 通过反应体系中添加的酶促混合物依次催化 NADP<sup>+</sup>还原为 NADPH, 且 NADPH 生成量与前一步反应中 ADP 生成量呈正比。

传统方法是通过检测 340nm 下 NADPH 增加量, 但该法检测灵敏度低, 且易受到色素 (如绿色叶片) 干扰, 本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法: 该酶促过程产生的 NADPH 与特异的显色探针反应生成有色物质, 通过在 450nm 下检测该有色物质的增加速率, 进而计算出 SSS 酶活性大小。

### 二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 90mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 6.5 mL×1 瓶	4°C保存	1. 呈分散状态, <b>用前务必摇匀</b> , 即可使用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉体 1 支	4°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1 mL 的蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	粉体 1 瓶	4°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 6.5 mL 的试剂一溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉体 1 瓶	4°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 41mL 的试剂一溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂六	粉体 1 瓶	4°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 4.5mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂七	液体 4.2mL×1 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉剂 1 支	-20°C保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

### 三、所需的仪器和用品:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

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：

称取约 0.1g 组织（水分多的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取

## 2、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，设定温度 25℃，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	280	300
试剂二（用前务必摇匀）	60	60
试剂三	20	
试剂四	60	60
混匀，30℃反应 20min，沸水浴(95-100℃)2min，12000rpm，4℃离心 10min，上清液待测。		

- ③ 显色反应，在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

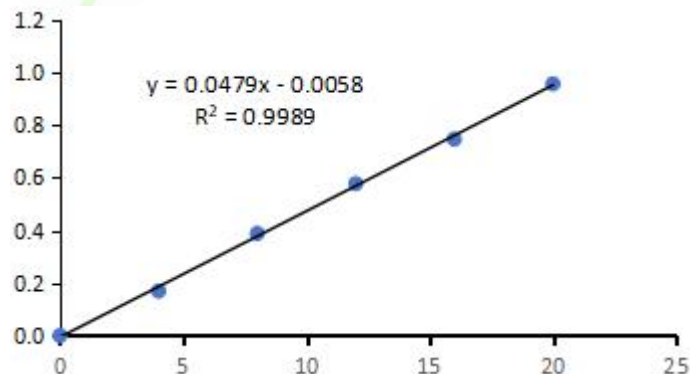
上清液	300	300
试剂五	380	380
试剂六	40	40
试剂七	40	40
混匀，室温（25℃）孵育 15min，立即于 450nm 处读取吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需做一个样本自身对照）。		

【注】：1.若 $\Delta A$  过小，可加大样本量  $V_1$ （如：增至 120 $\mu$ L，则试剂一相应减少，反应总体积不变）；或延长②步中 30℃的反应时间  $T$ （如：延至 30min 或更长）；或增加样本取样质量  $W$ ；则调整后的  $V_1$  和  $T$  和  $W$  需代入计算公式重新计算。

2. 若  $A$  测定大于 1，则可在③步中对上清液用蒸馏水进行稀释，稀释倍数  $D$  代入公式计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0479x - 0.0058$ ， $x$  是 NADPH 摩尔质量：nmol， $y$  是  $\Delta A$ 。



2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SSS(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0058) \div 0.0479 \times (V_3 \div V_2)] \div (C_{\text{pr}} \times V_1) \div T \times D$$

$$=21.7 \times (\Delta A + 0.0058) \div Cpr \times D$$

### 3、按照样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} SSS(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0058) \div 0.0479 \times (V3 \div V2)] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 21.7 \times (\Delta A + 0.0058) \div W \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入样本体积，0.08mL；  
V2---上清液体积，300μL； V3---反应体系总体积，500μL；  
T---反应时间，20min； W---样本质量； D---稀释倍数，未稀释即为 1；  
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 向标准品 EP 管里面加入 0.6mL 蒸馏水（母液需在两天内用且 -20℃ 保存），标准品母液浓度为 1nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. nmol/μL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 0.5nmol/μL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 nmol/μL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	40	
蒸馏水		40
试剂一	680	680
试剂七	40	40
混匀，10min 后，于 450nm 处读取吸光值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		