

可溶性淀粉合成酶（SSS）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC10351

规格：25T/24S、50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称/规格	25T	50T	保存条件
提取液	液体 25 mL×1 瓶	液体 50 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	液体 40 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂六	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20℃保存
试剂七	液体 250 μL×2 支	液体 250 μL×3 支	-20℃保存
试剂八	液体 12.5 μL×1 瓶	液体 12.5 μL×2 瓶	4℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂四：临用前加入 5 mL 试剂一溶解。
- 2、试剂五：临用前加入 8 mL 试剂一溶解。
- 3、试剂六：临用前取 1 支加入 208 μL 双蒸水，充分溶解备用，用不完的试剂 4℃保存。
- 4、试剂七：可分装后-20℃保存，不可反复冻融。
- 5、试剂八：临用前加入溶解好的 4 mL 试剂四。
- 6、反应液I：临用前在试剂二中加入 7 mL 试剂一，缓慢加热，逐渐升温使其溶解，冷却后加入试剂三混合溶解。

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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液枪、1mL 石英比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

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）

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
反应液I	270
混匀，30°C保温 20min，置沸水浴中 1min（盖紧，防止水分散失），冰浴冷却	
试剂八	150
混匀，30°C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°C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 340 nm 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：反应液I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。

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

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。

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

$V_{\text{测}}$ ：测量体积，0.78mL； $V_{\text{反应}}$ ：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。

实验实例：

- 1、取约 0.1g 肝脏加入 1mL 提取液，冰浴中匀浆。10000g，4°C离心 10 分钟，取上清置冰上待测。之后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.394 - 0.211 = 0.183$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{SSS 活性 (U/g 质量)} = 43.2 \times \Delta A \div W = 79.056 \text{ U/g 质量。}$$

- 2、取约 0.1g 冬青加入 1mL 提取液，冰浴中匀浆。10000g，4°C离心 10 分钟，取上清置冰上待测。之后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 1.31 - 1.303 = 0.007$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{SSS 活性 (U/g 质量)} = 43.2 \times \Delta A \div W = 3.024 \text{ U/g 质量。}$$

参考文献：

[1] Jiang H, Dian W, Wu P. Effect of high temperature on fine structure of amylopectin in rice endosperm by reducing the activity of the starch branching enzyme[J]. Phytochemistry, 2003, 63(1): 53-59.