

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K1202-M

产品规格: 48T(24 samples)/96T(48 samples)

检测仪器: 酶标仪(340 nm)

Elabscience®可溶性淀粉合成酶 (SSS)

比色法测试盒

Soluble Starch Synthase (SSS) Activity Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测植物组织样本中可溶性淀粉合成酶(SSS)活性。

检测原理

可溶性淀粉合成酶(Soluble Starch Synthase, SSS)催化 ADPG 与引物反应, 将葡萄糖分子转移到引物上, 同时生成 ADP, 在酶作用下依次催化 NADP⁺还原为 NADPH, NADPH 生成量与前一步反应中 ADP 生成量呈正比, 340 nm 下测定 NADPH 增加量即可计算 SSS 活性。

本试剂盒检测植物组织样本时, 可能需要测定总蛋白浓度, 推荐使用考马斯亮蓝法(货号: E-BC-K168-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	2.5 mL×1 瓶	4.5 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	显色剂 C (Chromogenic Agent C)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔紫外酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(340 nm)、匀浆机、水浴锅、离心机、恒温箱。

试剂准备

① 检测前，将试剂盒中的试剂平衡至25°C。

② 试剂三工作液配制：

取一瓶试剂三，加入5.5 mL试剂二溶解，未用完的试剂，分装后可-20°C保存1个月，避免反复冻融。

③ 试剂四工作液配制：

取一支试剂四，加入3 mL试剂二溶解，未用完的试剂，分装后可-20°C保存1个月，避免反复冻融。

④ 试剂六工作液配制：

取一支试剂六，加入0.15 mL试剂二溶解，未用完的试剂，分装后可-20°C保存1个月，避免反复冻融。

⑤ 试剂七工作液配制：

取一支试剂七，加入0.15 mL试剂二溶解，未用完的试剂，分装后可-20°C保存1个月，避免反复冻融。

⑥ 显色工作液配制：

将试剂五，试剂六工作液和试剂七工作液按照体积比40: 2.5: 2.5的比例配制，现配现用，按需配制，配制好的显色工作液20min内使用完毕。

实验关键点

显色反应速率较快，建议一批测量不要超过 20 个孔。

样本准备

① 样本处理

植物组织样本：称取0.1 g样本，加入0.9 mL试剂一匀浆， $10000 \times g$ ， 4°C 离心10 min，取上清液待测。留取部分上清液用于蛋白浓度测定。

对照样本：取0.3 mL待测上清液于新的EP管中，沸水浴5 min，流水冷却，作对照样本。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的检测范围： 166.25 U/g - 16625 U/g ，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%土豆组织	不稀释	10%红薯组织	不稀释
10%玉米组织	不稀释	-	-

注：稀释液为试剂一。

操作步骤

酶促反应

① 对照管：取 $50 \mu\text{L}$ 对照样本加入相应的 1.5 mL EP 管中。

测定管：取 $50 \mu\text{L}$ 待测样本加入相应的 1.5 mL EP 管中。

② 向步骤①中的每管加入 $90 \mu\text{L}$ 试剂三工作液。

③ 混匀， 30°C 孵育 20 min 后，沸水浴 1 min(盖紧，防止水分散失)，流水冷却。

④ 向步骤③中每管加入 $50 \mu\text{L}$ 试剂四工作液。

⑤ 混匀， 30°C 孵育 30 min 后，沸水浴 1 min(盖紧，防止水分散失)，流水冷却， $10000 \times g$ ， 4°C 离心 10 min。

显色反应

① 取酶促反应步骤⑤中的上清液 100 μL 于紫外微孔板中, 加入 45 μL 显色工作液。

② 混匀, 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 340 nm 测定各孔 OD 值。

操作表

酶促反应

	对照管	测定管
待测样本(μL)	--	50
对照样本(μL)	50	--
试剂三工作液(μL)	90	90
混匀, 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 置沸水浴中 1 min(盖紧, 防止水分散失), 流水冷却。		
试剂四工作液(μL)	50	50
混匀, 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 置沸水浴中 1 min(盖紧, 防止水分散失), 流水冷却, 10000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清。		

显色反应

	对照孔	测定孔
上清液	100	100
显色工作液	45	45
混匀, 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 340 nm 测定各孔 OD 值。		

本试剂盒检测植物组织样本时, 可能需要测定总蛋白浓度, 推荐使用考马斯亮蓝法(货号: E-BC-K168-M)。

结果计算

① 按样本蛋白浓度计算:

定义: 30°C 条件下, 每毫克组织蛋白每小时催化产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{SSS 活性} \frac{\Delta A \times V_1}{(\text{U/mgprot}) \quad \varepsilon \times d} = \frac{\Delta A \times V_1}{\varepsilon \times d} \times 10^9 \times f \div (C_{\text{pr}} \times V_2) \div T \times 1.9^* = 6644 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times f$$

② 按照样本鲜重计算:

定义: 30°C 条件下, 每克组织每小时催化产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SSS 活性} \frac{\Delta A \times V_1}{(\text{U/g wet weight}) \quad \varepsilon \times d} &= \frac{\Delta A \times V_1}{\varepsilon \times d} \times 10^9 \times f \div (V_2 \div V_3 \times m) \div T \times 1.9^* \\ &= 6644 \times \Delta A \div m \times V_3 \times f \end{aligned}$$

注解:

ΔA : 测定孔 OD 值-对照孔 OD 值;

V_1 : 反应体系总体积, 0.145×10^{-3} L;

ε : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/(mol*cm);

d : 96 孔板光径, 0.4 cm;

V_2 : 加入样本体积, 0.05 mL;

V_3 : 加入试剂-提取液体积, 0.9 mL;

T : 反应时间, 1/3 h;

*: 反应体系稀释倍数;

C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mgprot /mL;

m : 样本质量, g;

10^9 : $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$;

f : 样本加入检测体系前的稀释倍数。

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	166.25 U/g-16625 U/g	批内差	3.2%-3.7%
灵敏度	166.25 U/g	批间差	4.1%-6.4%
稀释回收率	105%-106%		

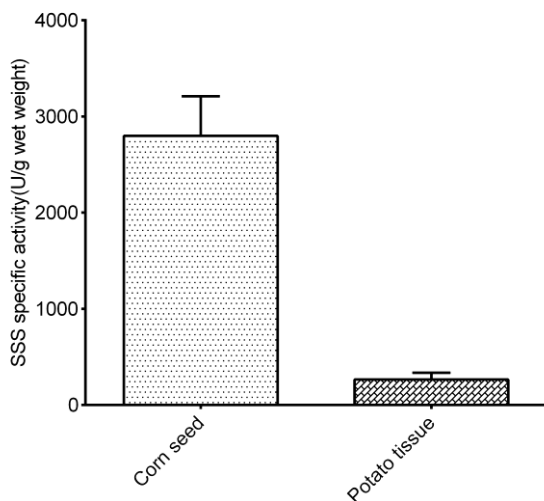
附录2 实例分析

例如检测玉米组织(数据仅供参考):

取 10% 的玉米组织样本匀浆上清及对照样本各 50 μL , 按操作表操作, 结果如下: 测定孔 OD 值为 0.294, 对照孔 OD 值为 0.240, 计算结果为:

$$\text{SSS 活性(U/g wet weight)} = (0.294 - 0.240) \times 6644 \div 0.1 \times 0.9 = 3229 \text{ U/g wet weight}$$

按照说明书操作, 测定 10% 玉米组织上清液(不稀释, 加样量 50 μL)、10% 土豆组织上清液(不稀释, 加样量 50 μL)中可溶性淀粉合成酶酶活(SSS)的含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	未严格按照说明书操作	严格按照说明书操作
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数,重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本,重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用,如将其用于临床诊断或任何其他用途,我公司将不对因此产生的问题负责,亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器,严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低,请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中,建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责,不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责,使用前请充分考虑样本可能的使用量,预留充足的样本。