

结合态淀粉合成酶（GBSS）试剂盒

（货号：ADS-W-DF008-48 微板法 48 样）

一、产品简介：

结合态淀粉合成酶 GBSS (EC 2.4.1.21) 以束缚态存在于淀粉体中，催化淀粉链的加长反应，主要负责直链淀粉的合成。GBSS 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⁺ 还原为 NADPH，且 NADPH 生成量与前一步反应中 ADP 生成量成正比。

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 GBSS 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 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 3.5 mL×1 瓶	4°C保存	呈分散状态,用前务必摇匀,即可使用。
试剂三	粉体 1 支	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部,再加 0.6 mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂四	粉体 1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部,再加 3.5 mL 的试剂一溶解备用。
试剂五	粉体 1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部,再加 9mL 的试剂一溶解备用。
试剂六	粉体 1 支	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部,再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂七	液体 1mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 1 支	-20°C保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、结合态淀粉合成酶（GBSS）活性检测：

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°C 离心 10min，弃上清，在沉淀中加入 1mL 提取液充分混匀，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 酶标仪预热 30min 以上，设定温度 25°C，调节波长至 450nm。

② 所有试剂解冻至室温（25°C），在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本（悬浮液）	40	40
试剂一	140	150
试剂二（用前务必摇匀）	30	30
试剂三	10	
试剂四	30	30

上清液	100	100
试剂五	80	80
试剂六	10	10
试剂七	10	10
混匀，室温（25℃）孵育 15min，立即于 450nm 处读取吸光值。ΔA=A 测定-A 对照（每个样本需做一个样本自身对照）。		
混匀，30℃反应 20min，沸水浴(95-100℃)2min，12000rpm，4℃离心 10min，上清液待测。		

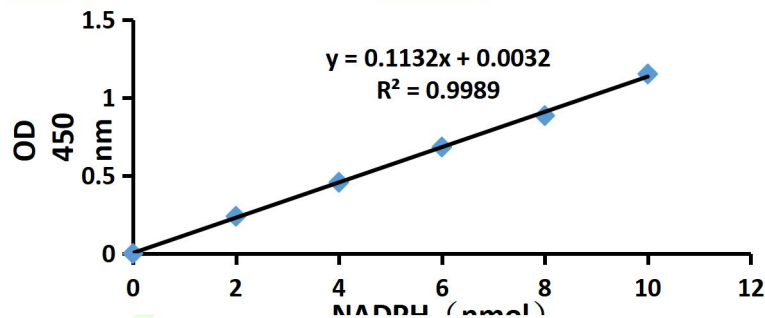
③ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

【注】：1.若ΔA 过小，可加大样本量 V1（如：增至 80μL，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 V1 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 = 0.1132x + 0.0032，x 是 NADPH 摩尔质量：nmol，y 是 ΔA。



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。

$$\text{GBSS (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0032) \div 0.1132 \times (V3 \div V2)] \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$

$$= 27.6 \times (\Delta A - 0.0032) \div Cpr \times D$$

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。

$$\text{GBSS (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0032) \div 0.1132 \times (V3 \div V2)] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 27.6 \times (\Delta A - 0.0032) \div W \times D$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

V2---上清液体积，100μL；

V3---反应体系总体积，250μL；

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 制备标准品母液 (1nmol/ μ L): 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°C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/ μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 10 μ L 的标准品+180 μ L 蒸馏水+10 μ L 试剂七, 混匀 10min 后, 于 450nm 处读取吸光值, 根据结果即可制作标准曲线。