

结合态淀粉合成酶（Granule-bound starch synthase, GBSS）试剂盒

（货号：ADS-W-DF008 微板法 96 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×2 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 6.5 mL×1 瓶	4℃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℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部,再加 1.1 mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂四	粉体 1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部,再加 6.5 mL 的试剂一溶解备用。
试剂五	粉体 1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部,再加 17.5 mL 的试剂一溶解备用。
试剂六	粉体 1 支	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部,再加 2.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂七	液体 2.2mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	-20℃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℃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℃，调节波长至 450nm。

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（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

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，
入：

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)。		

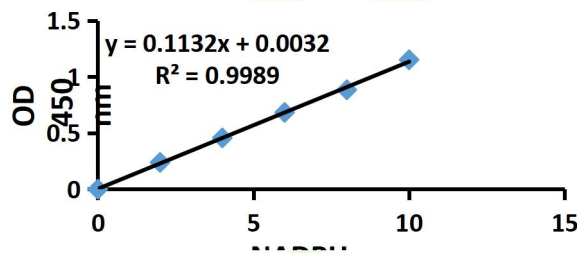
在 96 孔板中依次加

【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。

$$\begin{aligned} \text{GBSS (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.0032) \div 0.1132 \times (V3 \div V2)] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ &= 27.6 \times (\Delta A - 0.0032) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{GBSS (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.0032) \div 0.1132 \times (V3 \div V2)] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 27.6 \times (\Delta A - 0.0032) \div W \times D \end{aligned}$$

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/μL)：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)。
- 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/μL。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。

