

结合态淀粉合成酶（GBSS）试剂盒

（货号：ADS-W-DF008-24 微板法 24 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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 生成量呈正比。

传统方法是通过检测 340nm 下 NADPH 增加量，但该方法检测灵敏度低，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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 2 mL×1 支	4℃保存	1. 呈分散状态，用前务必摇匀，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℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 0.3mL 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 支	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.75 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℃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 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 支	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 0.6mL 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 0.5mL×1 支	4℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	-20℃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、实验器材：

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）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、结合态淀粉合成酶（GBSS）活性检测：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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、检测步骤：

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：

试剂组分（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，在 96 孔板中依次加入：

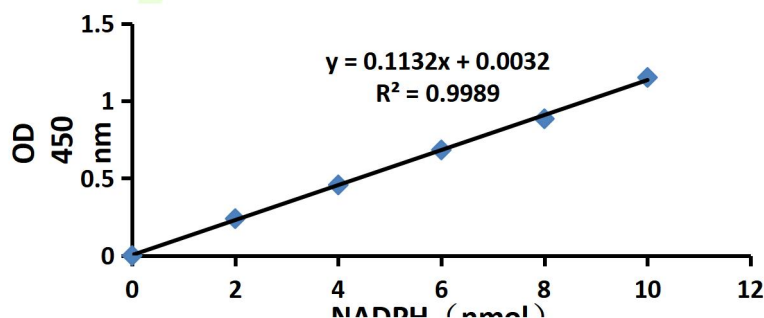
上清液	100	100
试剂五	80	80
试剂六	10	10
试剂七	10	10
混匀，室温（25℃）孵育 15min，立即于 450nm 处读取吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需做一个样本自身对照）。		

【注】：1.若 ΔA 过小，可加大样本量 V_1 （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 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： $y = 0.1132x + 0.0032$ ， 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。

$$\begin{aligned} \text{GBSS (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.0032) \div 0.1132 \times (V_3 \div V_2)] \div (C_{\text{pr}} \times V_1) \div T \times D \\ &= 27.6 \times (\Delta A - 0.0032) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

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。

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

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/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 10μL 的标准品+180μL 蒸馏水+10μL 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。