

## 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 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<sup>+</sup>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 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   | 1. 呈分散状态，用前务必摇匀，即可使用；<br>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）；<br>2. 加入 1.1 mL 的蒸馏水溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。  |
| 试剂四  | 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）；<br>2. 加入 6.5 mL 的试剂一溶解备用；<br>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）；<br>2. 加入 17.5 mL 的试剂一溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂六  | 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）；<br>2. 加入 2.2mL 蒸馏水溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。    |
| 试剂七  | 液体 2.2mL×1 瓶  | 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；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>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：

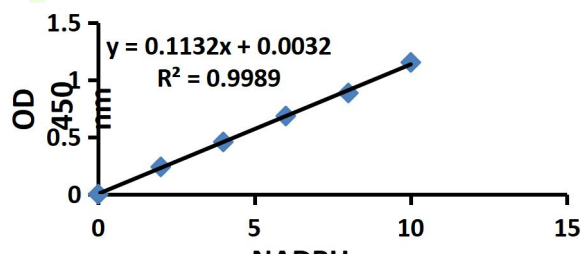
|                                                                                                   |     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 上清液                                                                                               | 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 $\Delta A$  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 $\Delta A$ 。



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。

$$\text{GBSS}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0032) \div 0.1132 \times (V_3 \div V_2)] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D \\ = 27.6 \times (\Delta A - 0.0032) \div W \times D$$

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°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/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。