

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

（货号：ADS-F-DF008-24 分光法 24 样 有效期：3 个月）

### 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<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：

| 试剂名称 | 规格            | 保存要求   | 备注                                                                      |
|------|---------------|--------|-------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶   | 4℃保存   |                                                                         |
| 试剂一  | 液体 45mL×1 瓶   | 4℃保存   |                                                                         |
| 试剂二  | 液体 3.5 mL×1 瓶 | 4℃保存   | 1. 呈分散状态， <b>用前务必摇匀</b> ，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 0.55mL 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 3.25mL 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 21mL 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 2.25mL 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 2.1mL×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、所需的仪器和用品：

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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

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 可见分光光度计预热 30min 以上，设定温度 25℃，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

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）                                                    | 80  | 80  |
| 试剂一                                                        | 280 | 300 |
| 试剂二（用前务必摇匀）                                                | 60  | 60  |
| 试剂三                                                        | 20  |     |
| 试剂四                                                        | 60  | 60  |
| 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 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

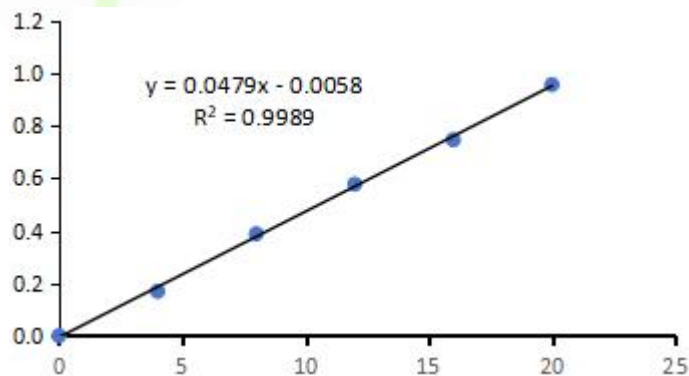
|                                                                   |     |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 上清液                                                               | 300 | 300 |
| 试剂五                                                               | 380 | 380 |
| 试剂六                                                               | 40  | 40  |
| 试剂七                                                               | 40  | 40  |
| 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）。 |     |     |

【注】：1.若ΔA 过小，可加大样本量 V1（如：增至 120μL，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： $y = 0.0479x - 0.0058$ ，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。

$$\text{GBSS}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0058) \div 0.0479 \times (V_3 \div V_2)] \div (C_{pr} \times V_1) \div T \times D$$

$$= 21.7 \times (\Delta A + 0.0058) \div C_{pr} \times D$$

### 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。

$$\text{GBSS}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0058) \div 0.0479 \times (V_3 \div V_2)] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D$$

$$= 21.7 \times (\Delta A + 0.0058) \div W \times D$$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入样本体积，0.08mL； V2---上清液体积，300μL；

V3---反应体系总体积，500μL； T---反应时间，20min； W---样本质量；

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 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），标准品母液浓度为 1nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. nmol/μL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

|                                                      |     |     |     |     |     |     |
|------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 0.5nmol/μL 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
| 标品浓度<br>nmol/μL                                      | 0   | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 标品稀释液<br>uL                                          | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL                                                 | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                            |     |     |     |     |     |     |

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

| 试剂名称 (μL)                                                                  | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|----------------------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 标品                                                                         | 40  |              |
| 蒸馏水                                                                        |     | 40           |
| 试剂一                                                                        | 680 | 680          |
| 试剂七                                                                        | 40  | 40           |
| 混匀，10min 后，于 450nm 处读取吸光值，<br>$\Delta A = A_{\text{测定}} - 0 \text{ 浓度管}$ 。 |     |              |