

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

（货号：BP10302W 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⁺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； 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 1.1 mL 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 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 6.5 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 17.5 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）； 2. 加入 2.2mL 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 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； 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、指标测定：

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）。		

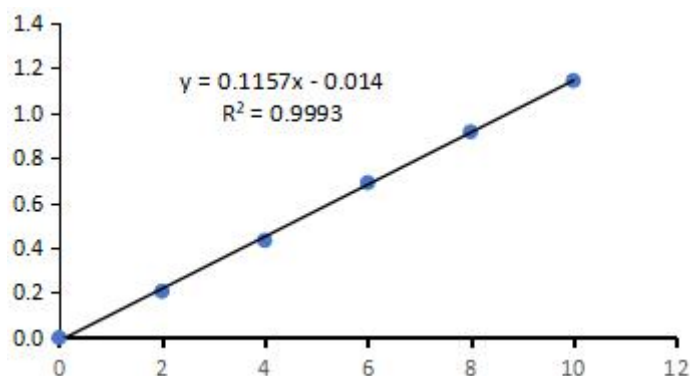
96 孔板中依次加

【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： $y = 0.1157x - 0.014$ ， 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。

GBSS (nmol/min/mg prot)=[$(\Delta A + 0.014) \div 0.1157 \times (V_3 \div V_2)$] $\div (C_{pr} \times V_1) \div T \times D$

$$=27 \times (\Delta A + 0.014) \div C_{pr} \times D$$

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。

$$GBSS(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.014) \div 0.1157 \times (V_3 \div V_2)] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D$$

$$=27 \times (\Delta A + 0.014) \div W \times D$$

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 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, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. 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：

标品浓度 nmol/μL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 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	10	
蒸馏水	180	190
试剂七	10	10
混匀，10min 后，于 450nm 处读取吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		