

结合态淀粉合成酶（GBSS）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PYHA4-C24	结合态淀粉合成酶（GBSS）试剂盒	24T	常量法
PYHA4-C48		48T	常量法

产品说明：

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；进一步通过反应 体系中添加的丙酮酸激酶、己糖激酶和6-磷酸葡萄糖脱氢酶依次催化NADP⁺还原为NADPH，其中NADPH生成量 与前一步反应生成的ADP数量呈正比，通过340nm下测定NADPH的增加量，可以计算GBSS活性。

试剂组成：

试剂名称	25T	50T	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	液体 16 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二A	粉剂×1瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存
试剂二B	粉剂×1支	粉剂×2 支	-20℃ 保存
试剂二C	粉剂×1支	粉剂×2 支	-20℃ 保存
试剂三A	液体 5mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三B	粉剂×1支	粉剂×2 瓶	-20℃ 保存
试剂四	液体 16μL×1 支	液体 30μL×1 支	2-8℃ 保存
试剂五A	液体 8mL×1 瓶	液体 18mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂五B	粉剂×1瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存
试剂五C	粉剂×1支	粉剂×2 支	2-8℃ 保存
试剂六	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20℃ 保存
试剂七	粉剂×1支	粉剂×1支	-20℃ 保存

24T 溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前取试剂二A 加入 8 mL 试剂一，缓慢加热，逐渐升温至煮沸使其溶解，冷却后加入试剂二 B 和试剂二 C 混合溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融。
- 2、试剂三：临用前试剂三B 加入试剂三A 溶解备用，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融。

- 3、试剂四：临用前先离心，取7 μL 试剂四加入2.24 mL 溶解好的试剂三混合备用（约14T），现用现配，也可根据样本量按比例配制。
- 4、试剂五：临用前取试剂五B 和试剂五C 加入试剂五A 中溶解备用，用不完的试剂-20℃分装保存4 周，避免反复冻融。
- 5、试剂六：临用前取 1 支加入208 μL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂-20℃分装保存2 周，避免反复冻融。
- 6、试剂七：临用前加入2mL 蒸馏水，用不完的试剂-20℃分装保存8 周，避免反复冻融。

48T 溶液的配制:

- 1、试剂二：临用前取 1 瓶试剂二A 加入 8mL 试剂一，缓慢加热，逐渐升温至煮沸使其溶解，冷却后加入 1 支试剂二B 和 1 支试剂二C 混合溶解，这样可以分两批配制并且测定，用不完的试剂-20℃分装保存2 周，避免反复冻融。
- 2、试剂三：临用前取 1 瓶试剂三B 加入 5mL 试剂三A 溶解备用，用不完的试剂-20℃分装保存4 周，避免反复冻融。
- 3、试剂四：临用前先离心，取 13 μL 试剂四加入4.16 mL 溶解好的试剂三混合备用（约27T），现用现配，也可根据样本量按比例配制。
- 4、试剂五：临用前取 1 瓶试剂五B 加入 8mL 试剂五A 和 1 支试剂五C 溶解备用，用不完的试剂-20℃分装 保存4 周，避免反复冻融。
- 5、试剂六：临用前取 1 支加入208 μL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂-20℃分装保存2 周，避免反复冻融。
- 6、试剂七：临用前加入2mL 蒸馏水，用不完的试剂-20℃分装保存8 周，避免反复冻融。

操作步骤:

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

称取约 0.1g 组织加入 1mL 提取液，冰浴中匀浆。10000g，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。

二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
- 2、在EP管中按顺序加入下列试剂

试剂名称 (μL)	测定管
样本	200
试剂二	270
涡旋混匀，30℃保温20min，置沸水浴中1min（盖紧，防止水分散失），冰浴冷却。	
试剂四	150
涡旋混匀，30℃保温30min，置沸水浴中1min（盖紧，防止水分散失），冰浴冷却，10000g，常温离心10min，取上清液待测。37℃预热试剂五和上清液。	

上清液	450
试剂五	300
试剂六	15
试剂七	15

混匀后立即在340nm 波长下记录初始吸光度A1 和 2min 后的吸光度A2，计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注意：试剂二如有沉淀，加入之前要使之充分溶解混匀。

三、GBSS活性计算

1、按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

GBSS活性 (U/mg prot) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{反总}} \times V_{\text{上清}}) \div T = 43.2 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$ 此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

2、按照样本质量计算

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

GBSS活性 (U/g 质量) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{反总}} \times V_{\text{上清}}) \div T = 43.2 \times \Delta A \div W$

V测：测量体积，0.78mL； V反总：反应体积，0.62mL； V提取：加入提取液体积，1mL； T：反应时间，20min； ϵ ：NADPH消光系数， $6.22 \times 10^{-3} \text{ mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$ ； d：石英比色皿光径，1cm； V样：加入样本的量，0.2mL； V上清：吸取上清液的量，0.45mL； Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL； W：样本质量，g。