

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
PMHD1-M96	结合态淀粉合成酶（GBSS）试剂盒	96T	微量法

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	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×2 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 16 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二A	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存
试剂二B	粉剂×2 支	-20℃ 保存
试剂二C	粉剂×2 支	-20℃ 保存
试剂三A	液体 12mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三B	粉剂×2 瓶	-20℃ 保存
试剂四	液体 27μL×1 支	2-8℃ 保存
试剂五A	液体 18mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂五B	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存
试剂五C	粉剂×2 支	2-8℃ 保存
试剂六	粉剂×3支	-20℃ 保存
试剂七	粉剂×1支	-20℃ 保存

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 12.5 μL 试剂四加入 4 mL 溶解好的试剂三混合备用（约53T），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

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/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。

2、在EP管中按顺序加入下列试剂

试剂名称(μL)	测定管
样本	100
试剂二	135
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	75
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。	
上清液	150
试剂五	100
试剂六	5
试剂七	5

混匀后立即转移 200μL 至微量石英比色皿或96 孔UV 板中，340nm 波长下记录初始吸光度A1 和2min 后的吸光度A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

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

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

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。

$$\text{GBSS活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{反总}} \times V_{\text{上清}}) \div T = 43.2 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

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

V_测: 测量体积, 0.26mL; V_样: 加入样本体积, 0.1mL; V_{反总}: 反应体积, 0.31mL; V_{上清}: 加入上清液 体积, 0.15mL; V_{提取}: 加入提取液体积, 1mL; ϵ : NADPH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^{-3} \text{ mL/nmol/cm}$; d: 比色皿光 径, 1cm; T: 反应时间, 20min; C_{pr}: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。

b.使用96孔板测定的计算公式如下:

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。

$$\text{GBSS活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{反总}} \times V_{\text{上清}}) \div T = 72 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{GBSS活性 (U/g 质量)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{反总}} \times V_{\text{上清}}) \div T = 72 \times \Delta A \div W$$

V_测: 测量体积, 0.26mL; V_样: 加入样本体积, 0.1mL; V_{反总}: 反应体积, 0.31mL; V_{上清}: 加入上清液 体积, 0.15mL; V_{提取}: 加入提取液体积, 1mL; ϵ : NADPH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^{-3} \text{ mL/nmol/cm}$; d: 96孔UV 板光径, 0.6cm; T: 反应时间, 20 min; C_{pr}: 样本蛋白质浓度, mg/mL, 需要另行测定; W: 样本质量, g。