

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

试剂盒说明书

分光光度法

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

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。

测定原理:

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。

组成:

产品名称	SA003-25T/24S	SA003-50T/48S	Storage
提取液: 液体	60ml×2	60ml×2	4°C
试剂一: 液体	25ml	50ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	1 瓶	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	1 瓶	4°C
试剂四: 粉剂	1 瓶	1 瓶	4°C
试剂五: 液体	1 瓶	1 瓶	-20°C
试剂六: 粉剂	1 瓶	1 瓶	-20°C
说明书	1 份		

SA003-25T/24S 试剂二临用前加入 7ml 试剂一充分混匀备用; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;

SA003-25T/24S 试剂三临用前加入 4ml 试剂一充分混匀备用; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;

SA003-25T/24S 试剂四临用前加入 9ml 试剂一充分混匀备用; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;

SA003-25T/24S 试剂五临用前加入 0.5ml 蒸馏水, 充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;



SA003-25T/24S 试剂六临用前加入 0.5ml 蒸馏水，充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

SA003-50T/48S 试剂二临用前加入 14ml 试剂一充分混匀备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

SA003-50T/48S 试剂三临用前加入 8ml 试剂一充分混匀备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

SA003-50T/48S 试剂四临用前加入 17ml 试剂一充分混匀备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

SA003-50T/48S 试剂五临用前加入 1ml 蒸馏水，充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

SA003-50T/48S 试剂六临用前加入 1ml 蒸馏水，充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

自备仪器和用品：

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、移液器、1 ml 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液制备：

称取 0.1~0.2g 组织（建议称取约 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。

测定步骤：

- 1、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	150
试剂二	270

混匀，30℃保温 20 min，置沸水浴中 1 min（盖紧，防止水分散失），冰浴冷却

试剂三	150
-----	-----

混匀，30℃保温 30 min，置沸水浴中 1 min（盖紧，防止水分散失），冰浴冷却，10000g 4℃离心 10min，取上清液（如果一次性测定样本较多，可将试剂四、五和六按比例配成混合液）

上清液	450
试剂四	300
试剂五	15
试剂六	15

混匀后立即 340 nm 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。

GBSS 活性计算：

- 1、按样本蛋白浓度计算：



单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GBSS (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \times \text{稀释倍数} \\ = 529 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

2、按照样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GBSS 活性 (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times \text{稀释倍数} \\ = 529 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积， 7.8×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.15 ml；V 样总：加入提取液体积，1 ml；T：反应时间，2 min；稀释倍数：1.9；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/ml；W：样本质量。

