

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

试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：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。

需自备的的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 100mL×2 瓶，4℃ 保存；

试剂一：40mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；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；

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；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；

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 10mL 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；

试剂五：液体×1 支，-20℃ 保存；临用前加入 500 μL 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；

试剂六：粉剂×1 支，-20℃ 保存；临用前加入 500 μL 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；

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、分光光度计或酶标仪预热 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	75
试剂二	135

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	75
-----	----

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，可以将试剂四、五和六按比例配成混合液）

上清液	150
试剂四	100
试剂五	5
试剂六	5

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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

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：

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。

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

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。

$$\text{GBSS 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \times \text{稀释倍数} = 529 \times \Delta A \div W \\ V \text{ 反总: 反应体系总体积, } 2.6 \times 10^{-4} \text{ L; } \epsilon: \text{ NADPH 摩尔消光系数, } 6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm; } d: \text{ 比色皿光径, } 1 \text{ cm; } V \text{ 样: 加入样本体积, } 0.075 \text{ mL; } V \text{ 样总: 加入提取液体积, } 1 \text{ mL; } T: \text{ 反应时间, } 2 \text{ min; 稀释倍数: } 1.9; \text{ Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; } W: \text{ 样本质量。}$$

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。

$$\text{GBSS (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T \times \text{稀释倍数} \\ = 1059 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{GBSS 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \times \text{稀释倍数} \\ = 1059 \times \Delta A \div W$$

V 反总: 反应体系总体积, 2.6×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.075 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。