

结合态淀粉合成酶 (Granule-bound starch synthase, GBSS) 试剂盒 (货号: G0538W 微板法 96 样)

一、产品简介:

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, 但该方法检测灵敏度低, 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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
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	呈分散状态, 用前务必摇匀, 即可使用。
试剂三	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1 mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂四	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 6.5 mL 的试剂一溶解备用。
试剂五	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 17.5 mL 的试剂一溶解备用。
试剂六	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 2.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂七	液体 2.2mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、结合态淀粉合成酶 (GBSS) 活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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、上机检测:

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:

试剂名称 (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 96 孔板中依次加入:

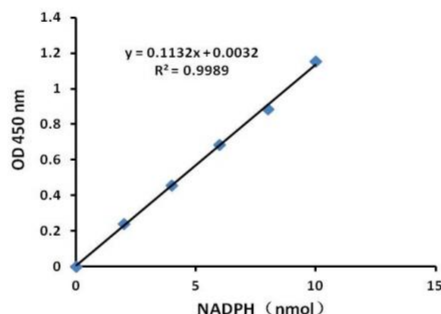
上清液	100	100
试剂五	80	80
试剂六	10	10
试剂七	10	10
混匀, 室温 (25℃) 孵育 15min, 立即于 450nm 处读取吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需做一个样本自身对照)。		

【注】: 1. 若 ΔA 过小, 可加大样本量 V_1 (如: 增至 80 μ L, 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: $y = 0.1132x + 0.0032$, 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。

$$\begin{aligned} \text{GBSS (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.0032) \div 0.1132 \times (V_3 \div V_2)] \div (Cpr \times V_1) \div T \times D \\ &= 27.6 \times (\Delta A - 0.0032) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{GBSS (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.0032) \div 0.1132 \times (V_3 \div V_2)] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D \\ &= 27.6 \times (\Delta A - 0.0032) \div W \times D \end{aligned}$$

V ---加入提取液体积, 1mL;

V_1 ---加入样本体积, 0.04mL;

V_2 ---上清液体积, 100 μ L;

V_3 ---反应体系总体积, 250 μ L;

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 制备标准品母液 (1nmol/ μ L): 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)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/ μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 10 μ L 的标准品 + 180 μ L 蒸馏水 + 10 μ L 试剂七, 混匀 10min 后, 于 450nm 处读取吸光值, 根据结果即可制作标准曲线。