

## 结合态淀粉合成酶（GBSS）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

**注意：**本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

**货号：**AC10574

**规格：**25T/24S、50T/48S

**产品组成：**使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称/规格	25T	50T	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	液体 100 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	液体 40 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂六	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20℃保存
试剂七	液体 250 μL×2 支	液体 250 μL×3 支	-20℃保存
试剂八	液体 12.5 μL×1 瓶	液体 12.5 μL×2 瓶	4℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂四：临用前每支加入 5 mL 试剂一。
- 2、试剂五：临用前每支加入 8 mL 试剂一。
- 3、试剂六：临用前取 1 支加入 208 μL 双蒸水，充分溶解备用，用不完的试剂 4℃保存。
- 4、试剂八：每支临用前加入溶解好的 4 mL 试剂四。
- 5、反应液I的配制：临用前在试剂二中加入 7 mL 试剂一，缓慢加热，逐渐升温使其溶解，冷却后加入试剂三混合溶解，这样可以分两批配制并且测定。

**产品说明：**

**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<sup>+</sup>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。

**注意：**实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

**需自备的仪器和用品：**

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL石英比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

**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、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
反应液I	270
混匀，30℃保温20min，置沸水浴中1min（盖紧，防止水分散失），冰浴冷却	
试剂八	150
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。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) =  $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{反总}} \times V_{\text{上清}}) \div T = 43.2 \times \Delta A \div W$

$V_{\text{测}}$ ：测量体积，0.78mL； $V_{\text{反总}}$ ：反应体积，0.62mL； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积，1mL； $T$ ：反应时间，20min； $\epsilon$ ：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； $V_{\text{样}}$ ：加入样本的量，0.2mL； $V_{\text{上清}}$ ：吸取上清液的量，0.45mL； $C_{\text{pr}}$ ：样本蛋白浓度，mg/mL； $W$ ：样本质量，g。

### 实验实例：

- 1、取0.1g肝脏加入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，之后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.19 - 0.178 = 0.012$ ，按样本质量计算：  
GBSS活性 (U/g 质量) =  $43.2 \times \Delta A \div W = 5.184 \text{ U/g 质量}$ 。
- 2、取0.1g柳树加入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，之后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 1.919 - 1.915 = 0.004$ ，按样本质量计算：  
GBSS活性 (U/g 质量) =  $43.2 \times \Delta A \div W = 1.728 \text{ U/g 质量}$ 。

### 参考文献：

[1] Jiang H, Dian W, Wu P. Effect of high temperature on fine structure of amylopectin in rice endosperm by reducing the activity of the starch branching enzyme[J]. Phytochemistry, 2003, 63(1): 53-59.