

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

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500μL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500μL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°C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°C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°C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。

$$\text{GBSS (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times \text{稀释倍数}$$
$$= 529 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{GBSS活性 (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times \text{稀释倍数} = 529 \times \Delta A \div W$$

V 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：比色皿光径，1cm；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。

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。

$$\text{GBSS (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times \text{稀释倍数}$$
$$= 1059 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

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。

www.affandi-e.com