

## 结合态淀粉合成酶（GBSS）活性检测试剂盒（微量法）

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。

产品货号：BA1175

产品规格：100管/96样

### 产品简介：

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。

### 产品内容：

| 试剂名称 | 规格          | 保存条件 |
|------|-------------|------|
| 提取液  | 液体100mL×2瓶  | 2-8℃ |
| 试剂一  | 液体35mL×1瓶   | 2-8℃ |
| 试剂二  | 粉剂×1瓶       | 2-8℃ |
| 试剂三  | 粉剂×1瓶       | -20℃ |
| 试剂四  | 粉剂×2瓶       | -20℃ |
| 试剂五  | 粉剂×1瓶       | -20℃ |
| 试剂六  | 粉剂×3支       | -20℃ |
| 试剂七  | 液体250μL×2支  | -20℃ |
| 试剂八  | 液体12.5μL×2支 | 2-8℃ |

### 溶液的配制：

1. 试剂四：临用前每支加入5mL试剂一。
2. 试剂五：临用前每支加入10mL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4mL试剂四。
5. 反应液 I 的配制：临用前在试剂二中加入14mL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。

### 需自备的仪器和用品：

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（UV板）、研钵、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



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

充分混匀，置冰上待测。

## 二、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   | 100 |
| 反应液I   | 135 |
| 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  | 75  |
| 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（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 |
| 试剂五  | 100 |
| 试剂六  | 5   |
| 试剂七  | 5   |

混匀后立即转移200μL 至微量石英比色皿或96孔板中，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

**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组织蛋白在1mL反应体系中每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GBSS活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{反总}} \times V_{\text{上清}}) \div T = 43.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{GBSS活性 (U/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{反总}} \times V_{\text{上清}}) \div T = 43.2 \times \Delta A \div W$$

V测：测量体积，0.26mL；V样：加入样本体积，0.1mL；V反总：反应体积，0.31mL；V上清：加入上清液体积，0.15mL；V提取：加入提取液体积，1mL；ε：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ mL/nmol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；T：反应时间，2min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g。

**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。

$$\text{GBSS活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{反总}} \times V_{\text{上清}}) \div T = 72 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{GBSS活性 (U/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{反总}} \times V_{\text{上清}}) \div T = 72 \times \Delta A \div W$$

V测：测量体积，0.26mL；V样：加入样本体积，0.1mL；V反总：反应体积，0.31mL；V上清：加入上清液体积，0.15mL；V提取：加入提取液体积，1mL；ε：NADPH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ mL/nmol/cm}$ ；d：比色皿光径，0.6cm；T：反应时间，20min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com