

颗粒结合型淀粉合成酶(GBSS)检测试剂盒说明书

Granule-bound starch synthase Assay Kit

微量法

货号: AK309

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES36	100mL×2 瓶	4℃保存;
AK309-A	40mL×2 瓶	4℃保存;
AK309-B	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 14mL AK309-A 充分混匀备用; 用不完的试剂 4℃保存一周;
AK309-C	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 8mL AK309-A 充分混匀备用; 用不完的试剂 4℃保存一周;
AK309-D	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 10mL AK309-A 充分混匀备用; 用不完的试剂 4℃保存一周;
AK309-E	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 4℃保存一周;
AK309-F	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 4℃保存一周;
工作液配制:	按照 AK309-D: AK309-E: AK309-F = 100: 5: 5 比例混匀即可,	

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 颗粒结合淀粉合成酶 (granule-bound starch synthase, GBSS, EC 2.4.1.21) 是决定直链淀粉合成的关键酶, 单子叶植物 GBSS 包含两种同工酶, 分别是 GBSSI 和 GBSSII, 双子叶植物只有 GBSSII 一种同工酶。GBSS 可以通过 α -1,4-D-糖苷键将 ADPG 中的葡萄糖残基添加到葡萄糖的非还原端, 能够延长葡萄糖的直链。是与发育中的丹菲结合的唯一有活力的蛋白。

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 数量成正比, 通过 340nm 下测定 NADPH 的增加量, 可以计算 GBSS 活性。

自备用品:

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。

粗酶液提取:

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/酶标仪预热30min 以上, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。

2. 在带盖的 EP 管中按顺序加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
样本	75
AK309-B	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	
AK309-C	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 25℃ 离心 10min, 取上清液待测,	

3. 在微量石英比色皿/96 孔板中按顺序加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
上清液	150
工作液	110
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 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

GBSS 活性计算公式:

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。

$$\text{GBSS (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times \text{稀释倍数} = 528 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

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。

$$\text{GBSS 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times \text{稀释倍数} = 528 \times \Delta A \div W$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2.85×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.075 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 2 min; 稀释倍数: 1.73; 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。

$$\text{GBSS (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times \text{稀释倍数} = 1056 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

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。

$$\text{GBSS 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times \text{稀释倍数} = 1056 \times \Delta A \div W$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2.85×10^{-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; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.075 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 2 min; 稀释倍数: 1.73; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量。