

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

分光光度法

货号: AK308

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES36	60mL×2 瓶	4℃保存;
AK308-液 1	7mL×2 瓶	4℃保存;
AK308-液 2	4mL×2 瓶	4℃保存;
AK308-液 3	8mL×2 瓶	4℃保存;
AK308-粉-1	粉剂 2 支	4℃保存;
AK308-粉-2	粉剂 2 支	4℃保存;
AK308-粉-3	粉剂 2 支	-20℃保存;
AK308-粉-4	粉剂 2 支	4℃保存;
AK308-粉-5	粉剂 2 支	4℃保存;
AK308-粉-6	粉剂 2 支	-20℃保存;
AK308-粉-7	粉剂 2 支	-20℃保存;
AK308-粉-8	粉剂 2 支	4℃保存;
AK308-粉-9	粉剂 2 支	4℃保存;
AK308-粉-10	粉剂 2 支	-20℃保存;
AK308-A	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;
AK308-B	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;
反应液 I 的配制:	临用前取粉 1、粉 2 和粉 3 各一支, 依次溶于液 1 中混合溶解。 (这样可以分两批配制并且测定)	
反应液 II 的配制:	临用前取粉 4、粉 5、粉 6、粉 7 各一支, 依次溶于液 2 中混合溶解。 (这样可以分两批配制并且测定)	
反应液 III 的配制:	临用前取粉 8、粉 9、粉 10 各一支, 依次溶于液 3 中混合溶解。 (这样可以分两批配制并且测定)	

※ 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、石英比色皿、研钵、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪和蒸馏水。

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	测定管 (μL)
样本	150
反应液 I	270
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，	
反应液 II	150
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	
上清液	450
反应液 III	300
AK308-A	10
AK308-B	10
混匀后立即在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：反应液 I 如有沉淀，加入之前要使之充分溶解混匀。

AAO 活性计算公式：

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。

$$\text{GBSS (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times \text{稀释倍数} = 522 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

※ 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。

$$\text{GBSS 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times \text{稀释倍数} = 522 \times \Delta A \div W$$

注： V 反总：反应体系总体积， 5.7×10^{-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，0.15 mL； V 样总：加入提取液体积，1 mL； T

：反应时间，2 min； 稀释倍数：1.71； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量。