

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⁺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提取液充分混匀，置冰上待测。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com