

## 结合态淀粉合成酶 (GBSS)活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHD1-C24	结合态淀粉合成酶 (GBSS)活性检测试剂盒	24T	常量法
PMHD1-C48		48T	

### 一、测定意义：

结合态淀粉合成酶(GBSS)活性测定是剖析直链淀粉合成途径的核心方法，其活性高低直接决定直链淀粉合成速率与含量，对解析作物淀粉品质形成机制、改良粮食营养与加工特性、优化工业淀粉原料属性，以及探索淀粉代谢紊乱疾病的分子机理具有重要意义。

### 二、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<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。

### 三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(24T)	试剂装量(48T)	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10mL×1 瓶	液体 16mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二 A	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	2-8℃保存
试剂二 B	粉剂 ×1 支	粉剂 ×2 支	-20℃保存
试剂二 C	粉剂 ×1 支	粉剂 ×2 支	-20℃保存
<b>试剂二的配制：</b> 临用前取1瓶试剂二A加入8mL试剂一，缓慢加热，逐渐升温至煮沸使其溶解，冷却后加入试剂二B和试剂二C混合溶解，-20℃分装保存2周，避免反复冻融。			
试剂三 A	液体 5mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三 B	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	2-8℃保存
<b>试剂三的配制：</b> 临用前试剂三B加入试剂三A溶解备用，-20℃分装保存4周，避免反复冻融。			
试剂四	液体 16μL×1支	液体 30μL×1支	-20℃保存
<b>试剂四的配制：</b> 临用前先离心，取7μL试剂四加入2.24 mL溶解好的			

试剂三混合备用（约14T），现用现配，也可根据样本量按比例配制。			
试剂五 A	液体 8mL×1瓶	液体 16mL×1瓶	2-8℃保存
试剂五 B	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	2-8℃保存
试剂五 C	粉剂 ×1 支	粉剂 ×2 支	2-8℃保存
<b>试剂五的配制：</b> 临用前取试剂五B和试剂五C加入试剂五A溶解备用，20℃分装保存4周，避免反复冻融。			
试剂六	粉剂 ×2 支	粉剂 ×4 支	-20℃保存
<b>试剂六的配制：</b> 临用前取1支加入208 μL蒸馏水充分溶解，-20℃分装保存2周，避免反复冻融。			
试剂七	粉剂 ×1 支	粉剂 ×1 支	-20℃保存
<b>试剂七的配制：</b> 临用前加入2mL蒸馏水，用不完的试剂-20℃分装保存8周，避免反复冻融。			

### 四、操作步骤：

#### 样本前处理

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液)，旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清，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。
- 2、测定前将试剂恢复至室温；
- 3、样本测定（在离心管中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定管
样本 (μL)	200
试剂二 (μL)	270
混匀，30℃保温 20min,置沸水浴中 1min(缠封口膜，防止爆盖),冰浴冷却。	
试剂四 (μL)	150
混匀，30℃保温 30min,置沸水浴中 1min(缠封口膜，防止爆盖),冰浴冷却，10000g,常温离心 10min，取上清液。37℃预热试剂五和上清	

液。	
上清液 (μL)	450
试剂五 (μL)	300
试剂六 (μL)	15
试剂七 (μL)	15
混匀后立即在 340nm 波长下记录初始吸光度 $A_1$ 和 2min 后的吸光度 $A_2$ , 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。

## 五、GBSS 活性计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

**单位定义：**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。

**计算公式：**  $GBSS (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (Cpr \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{反应}} \times V_{\text{上清}}) \div T = 43.2 \times \Delta A \div Cpr$

此法需要自行测定粗酶液蛋白质浓度。

2、按照样本质量计算：

**单位定义：**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。

**计算公式：**  $GBSS (U/g) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{反应}} \times V_{\text{上清}}) \div T = 43.2 \times \Delta A \div W$

$V_{\text{测}}$ ：测量体积，0.78mL； $V_{\text{反应}}$ ：反应体积，0.62mL； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积，1mL； $T$ ：反应时间，20min； $\epsilon$ ：NADPH 消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ mL}/(\text{nmolcm})$ ； $d$ ：1mL 石英比色皿光径，1cm； $V_{\text{样本}}$ ：加入样本的量，0.2mL； $V_{\text{上清}}$ ：吸取上清液的量，0.45mL； $Cpr$ ：样本蛋白浓度，mg/mL； $W$ ：样本质量，g。

## 六、注意事项：

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。

## 【厂家信息】

生产企业：南京陌凡生物科技有限公司

地址：南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

## 【售后微信】



## 【说明书核准及修改日期】

核准日期：2025 年 4 月 7 日

修改日期：2025 年 4 月 7 日