

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⁺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
试剂二的配制：	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
试剂三的配制：	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
试剂四的配制：	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
试剂五的配制： 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
试剂六的配制： 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
试剂七的配制： 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： $\text{GBSS (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (Cpr \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{反总}} \times$

$$V_{\text{上清}}) \div T = 43.2 \times \Delta A \div Cpr$$

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： $\text{GBSS (U/g)} = [\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{测}}] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{反总}} \times$

$$V_{\text{上清}}) \div T = 43.2 \times \Delta A \div W$$

$V_{\text{测}}$: 测量体积, 0.78mL; $V_{\text{反总}}$: 反应体积, 0.62mL; $V_{\text{提取}}$: 加入

提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 20min; ε : NADPH 消光系数,

$6.22 \times 10^3 \text{ mL/(nmolcm)}$; 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