

结合态淀粉合成酶 (Granule-bound starch synthase, GBSS)

试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

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。

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。

需自备的的仪器和用品

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、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

提取液: 液体 100mL×2 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 40mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 14mL 试剂一充分混匀备用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融;

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 8mL 试剂一充分混匀备用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融;

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 10mL 试剂一充分混匀备用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融;

试剂五: 液体×1 支, -20℃ 保存; 临用前加入 500 μL 蒸馏水, 充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融;

试剂六: 粉剂×1 支, -20℃ 保存; 临用前加入 500 μL 蒸馏水, 充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融;

粗酶液制备

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	75
试剂二	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

试剂三	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 4℃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
试剂四	100
试剂五	5
试剂六	5

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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意：试剂二如有沉淀，加入之前要使之充分溶解混匀。

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。

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

$$= 529 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

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。

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

$$= 529 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积， 2.6×10^{-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，0.075 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；稀释倍数：1.9；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。

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

$$= 1059 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

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。

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

$$= 1059 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积， 2.6×10^{-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 样：加入样本体积，0.075 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；稀释倍数：1.9；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量。