

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

### 试剂盒说明书

#### 分光光度法 25 管/24 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<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。

#### 需自备的的仪器和用品

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

#### 试剂的组成和配制

**提取液:** 液体 60mL×1 瓶, 4℃ 保存;

**试剂一:** 25mL×1 瓶, 4℃ 保存;

**试剂二:** 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 7mL 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 4mL 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 9mL 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 0.5mL 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 0.5mL 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	150
试剂二	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

试剂三	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 4℃ 离心 10min, 取上清液 (如果一次性测定样本较多, 可将试剂四、五和六按比例配成混合液)

上清液	450
试剂四	300
试剂五	15
试剂六	15

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

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。

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

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

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。

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

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

V 反总：反应体系总体积， $7.8 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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：1.267；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量。