（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K1203-M

产品规格：48T(24 samples)/96T(48 samples)

检测仪器：酶标仪(340 nm)

Elabscience®结合态淀粉合成酶（GBSS）比色法测试盒

Granule-Bound Starch Synthase(GBSS) Activity Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测植物组织样本中结合态淀粉合成酶(GBSS)活性。

检测原理

结合态淀粉合成酶(Granule-bound Starch Synthase, GBSS)催化 ADPG 与引物反应，将葡萄糖分子转移到引物上，同时生成 ADP，在酶作用下依次催化 $NADP^+$还原为 NADPH，NADPH 生成量与前一步反应中 ADP 生成量呈正比，340 nm 下测定 NADPH 增加量即可计算 GBSS 活性。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	60 mL×1 瓶	60 mL×2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	2.5 mL×1 瓶	4.5 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	显色剂 C (Chromogenic Agent C)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C避光 保存 6 个月
	96 孔紫外酶标板	96 孔×1 块		无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(340 nm)、匀浆机、水浴锅、离心机、恒温箱。

试剂准备

① 检测前，将试剂盒中的试剂平衡至25°C。

② 试剂三工作液配制：

取一瓶试剂三，加入5.5 mL试剂二溶解，未用完的试剂三工作液可-20°C分装保存1个月，避免试剂反复冻融。

③ 试剂四工作液配制：

取一支试剂四，加入3 mL试剂二溶解，未用完的试剂四工作液可-20°C分装保存1个月，避免试剂反复冻融。

④ 试剂六工作液配制：

取一支试剂六，加入0.15 mL试剂二溶解，未用完的试剂六工作液可-20°C分装保存1个月，避免试剂反复冻融。

⑤ 试剂七工作液配制：

取一支试剂七，加入0.15 mL试剂二溶解，未用完的试剂七工作液可20°C分装保存1个月，避免试剂反复冻融。

⑥ 显色工作液配制：

将试剂五：试剂六工作液：试剂七工作液按体积比=40：2.5：2.5配制，现配现用，配制好的显色工作液20min内使用有效。

实验关键点

显色反应速率较快，建议一批测量不要超过 20 个孔。

样本准备

① 样本处理

植物组织样本：称取0.1 g样本，加入0.9 mL试剂一匀浆，10000 × g，4°C离心10 min，去掉上清，加入0.9 mL试剂一混匀，置于冰上取混悬液待测。

对照样本：取0.3 mL 待测混悬液于新的EP管中，沸水浴5 min，流水冷却，作为对照样本。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的检测范围：83-6640 U/g wet weight，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%土豆组织	不稀释	10%红薯组织	不稀释
10%玉米组织	不稀释	-	-

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

① 样本匀浆过程保持低温，确保匀浆液无大颗粒，加样前使用移液枪吹打混匀，避免混悬液沉降。

② 显色反应速率较快，建议一次性检测不超过 20 孔。

操作步骤

酶促反应

① 对照管：取 50 μL 对照样本加入相应的 1.5 mL EP 管中。
测定管：取 50 μL 待测样本加入相应的 1.5 mL EP 管中。

② 向步骤①中的每管加入 90 μL 试剂三工作液。

③ 混匀，30°C孵育 40 min 后，沸水浴 1 min(盖紧 EP 管盖，防止试剂挥发)，流水冷却至室温 25°C。

④ 向步骤③中每管加入 50 μL 试剂四工作液。

⑤ 混匀，30°C孵育 30 min 后，沸水浴 1 min(盖紧 EP 管盖，防止试剂挥发)，流水冷却至室温 25°C，10000 × g，4°C离心 10 min。

显色反应

① 取酶促反应步骤⑤中的上清液 100 μL 于紫外酶标板中，向各孔中加入 45 μL 显色工作液。

② 混匀，37°C孵育 5 min，340 nm 测定各管 OD 值，计算$\Delta A=A_{测定}-A_{对照}$。

操作表

酶促反应

	对照管	**测定管**
待测样本(μL)	--	50
对照样本(μL)	50	--
试剂三工作液(μL)	90	90
混匀，30°C孵育 40 min，沸水浴 1 min(盖紧 EP 管盖，防止试剂挥发)，流水冷却至室温 25°C。		
试剂四工作液(μL)	50	50
混匀，30°C孵育 30 min，沸水浴 1 min(盖紧 EP 管盖，防止试剂挥发)，流水冷却至室温 25°C，10000 × g，4°C离心 10 min。		

显色反应

	对照孔	**测定孔**
上清液	100	100
显色工作液	45	45
混匀，37°C孵育 5 min，340 nm 测定各孔 OD 值，计算$\Delta A=A_{测定}-A_{对照}$。		

结果计算

定义：30°C条件下，每克组织每小时催化产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GBSS 活性 (U/g wet weight)} = \frac{\Delta A \times V_1}{\varepsilon \times d} \times 10^9 \times f \div (V_2 \div V_3 \times m) \div T \times 1.9^* = 3322 \times \Delta A \div m \times V_3 \times f$$

注解：

ΔA：$A_{测定}$-$A_{对照}$；

V_1：反应体系总体积，0.145×10^-3 L；

ε：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/(mol*cm)；

d：96 紫外酶标板光径，0.4 cm；

V_2：加入样本体积，0.05 mL；

V_3：加入试剂一提取液体积，mL；

T：反应时间，2/3 h；

*：反应体系稀释倍数；

m：样本质量，g；

10^9：1 mol = 10^9 nmol；

f：样本加入检测体系前的稀释倍数。

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	83-6640 U/g wet weight	**批内差**	1.4%-3.1%
灵敏度	83 U/g wet weight	**批间差**	2.8%-6.3%
稀释回收率	98%-101%		

附录2 实例分析

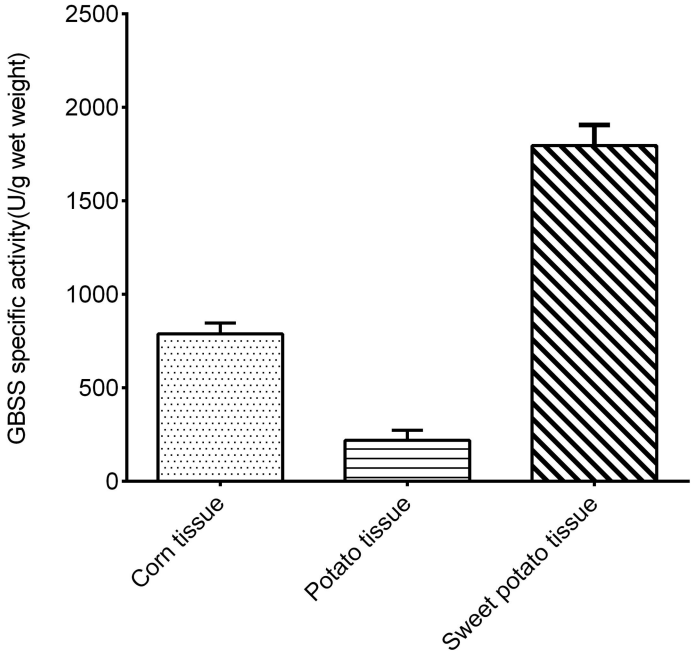
例如检测玉米组织(数据仅供参考):

取 10%的玉米组织混悬液 50 μL，按操作表操作，结果如下：测定孔 OD 值为 0.238，对照孔 OD 值为 0.214，计算结果为：

$$\text{GBSS活性(U/g wet weight)} = (0.238 - 0.214) \times 3322 \div 0.1 \times 0.9$$

$$= 717.5 \text{ U/g wet weight}$$

按照说明书操作，测定 10%玉米组织混悬液(不稀释，加样量 50 μL)、10%土豆组织混悬液(不稀释，加样量 50 μL)、10%红薯组织混悬液(不稀释，加样量 50 μL)中结合态淀粉合成酶（GBSS）活力(如下图)：



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。