

结合态淀粉合成酶(GBSS)试剂盒(可见显色法) (微板法)

产品货号: BA2689

产品规格: 96样

产品简介:

结合态淀粉合成酶GBSS(EC2.4.1.21)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。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, 通过反应体系中添加的酶促混合物依次催化NADP⁺还原为NADPH, 且NADPH生成量与前一步反应中ADP生成量呈正比。

传统方法是通过检测340nm下NADPH增加量, 但该方法检测灵敏度低, 且易受到色素(如绿色叶片)干扰, 本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法: 该酶促过程产生的NADPH与特异的显色探针反应生成有色物质, 通过在450nm下检测该有色物质的增加速率, 进而计算出GBSS酶活性大小。

产品内容:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体120mL×2瓶	2-8℃	
试剂一	液体60mL×1瓶	2-8℃	
试剂二	液体6.5mL×1瓶	2-8℃	呈分散状态, 用前务必摇匀, 即可使用。
试剂三	粉剂mg×1支	2-8℃	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加1.1mL的蒸馏水溶解备用。
试剂四	粉剂mg×1瓶	2-8℃	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加6.5mL的试剂一溶解备用。
试剂五	粉剂mg×1瓶	2-8℃	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加17.5mL的试剂一溶解备用。
试剂六	粉剂mg×1瓶	2-8℃	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加2.2mL的蒸馏水溶解备用。
试剂七	液体2.2mL×1瓶	2-8℃	
标准品	粉剂mg×1支	-20℃	若重新做标曲, 则用到该试剂。

所需的仪器和用品:

酶标仪、96孔板、可调式移液器、台式离心机、水浴锅、研钵、冰和蒸馏水。

结合态淀粉合成酶(GBSS)活性测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1. 样品制备:

称取约0.1g, 组织(水分多的样本可取0.5g), 加入1mL提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 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。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10的比例提取

2. 上机检测:

① 酶标仪预热30min以上, 设定温度25℃, 调节波长至450nm。

② 所有试剂解冻至室温(25℃), 在EP管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本 (悬浮液)	40	40
试剂一	140	150
试剂二 (用前务必摇匀)	30	30



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

试剂三	10	
试剂四	30	30
混匀，30℃反应20min，沸水浴（95-100℃）2min，12000rpm，4℃离心10min，上清液待测。		

③ 显色反应，在96孔板中依次加入：

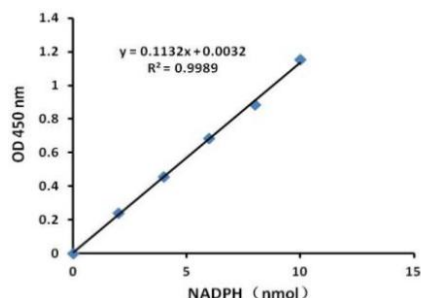
试剂名称（μL）	测定管	对照管
上清液	100	100
试剂五	80	80
试剂六	10	10
试剂七	10	10
混匀，室温(25℃)孵育15min，立即于450nm处读取吸光值。ΔA=A测定-A对照(每个样本需做一个样本自身对照)。		

【注】：1. 若ΔA过小，可加大样本量V1(如：增至80μL，则试剂一相应减少，反应总体积不变)；或延长②步中30℃的反应时间T(如：延至30min或更长)；或增加样本取样质量W；则调整后的V1和T和W需代入计算公式重新计算。

2. 若A测定大于1，则可在③步中对上清液用蒸馏水进行稀释，稀释倍数D代入公式计算。

结果计算：

1. 标准曲线方程：y=0.1132x+0.0032，x是NADPH摩尔质量：nmol，y是ΔA。



2. 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GBSS (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0032) \div 0.1132 \times (V_3 \div V_2)] \div (C_{pr} \times V_1) \div T \times D$$

$$= 27.6 \times (\Delta A - 0.0032) \div C_{pr} \times D$$

3. 按照样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GBSS (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0032) \div 0.1132 \times (V_3 \div V_2)] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D$$

$$= 27.6 \times (\Delta A - 0.0032) \div W \times D$$

V---加入提取液体积，1mL；V1---加入样本体积，0.04mL；V2---上清液体积，100μL；V3---反应体系总体积，250μL；T---反应时间，20min；W---样本质量；D---稀释倍数，未稀释即为1；Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的BCA蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1. 制备标准品母液(1nmol/μL)：向标准品EP管里面加入0.6mL蒸馏水(母液需在两天内用且-20℃保存)。
2. 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0nmol/μL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
3. 10μL的标准品+180μL蒸馏水+10μL试剂七，混匀10min后，于450nm处读取吸光值，根据结果即可制作标准曲线。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com