

结合态淀粉合成酶(GBSS)试剂盒(可见显色法)

(可见分光光度法)

产品货号: BA2688

产品规格: 48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×1瓶	2-8℃	
试剂一	液体90mL×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41mL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4.5mL的蒸馏水溶解备用。
试剂七	液体4.2mL×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:

可见分光光度计、1mL玻璃比色皿(光径1cm)、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 可见分光光度计预热30min以上,设定温度25℃,调节波长至450nm,蒸馏水调零。

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)	80	80
试剂一	280	300
试剂二(用前务必摇匀)	60	60



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

试剂三	20	
试剂四	60	60
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1mL玻璃比色皿（光径1cm）中依次加入：

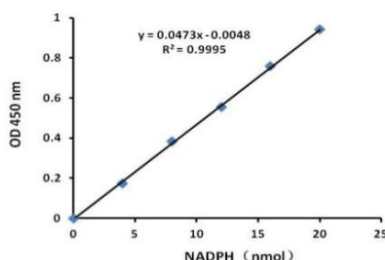
试剂名称（μL）	测定管	对照管
上清液	300	300
试剂五	380	380
试剂六	40	40
试剂七	40	40
混匀，室温(25℃)孵育15min，立即于450nm处读取吸光值。ΔA=A测定-A对照(每个样本需做一个样本自身对照)。		

【注】：1. 若ΔA过小，可加大样本量V1(如：增至120μL，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=0.0473x-0.0048，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。

$$\text{GBSS (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0473 \times (V3 \div V2)] \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$

$$= 22 \times (\Delta A + 0.0048) \div Cpr \times D$$

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。

$$\text{GBSS (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0473 \times (V3 \div V2)] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 22 \times (\Delta A + 0.0048) \div W \times D$$

V---加入提取液体积，1mL；V1---加入样本体积，0.08mL；V2---上清液体积，300μL；V3---反应体系总体积，500μL；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：0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5nmol/μL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
3. 40μL的标准品+680μL蒸馏水+40μL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

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com