



结合态淀粉合成酶(GBSS)试剂盒(可见显色法)

可见分光光度法

货号: R43951-48S

产品简介:

结合态淀粉合成酶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。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。

试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体120mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体90mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	液体6.5 mL×1瓶	4℃保存	呈分散状态, 用前务必摇匀, 即可使用。
试剂三	粉体mg×1支	4℃保存	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	粉体mg×1瓶	4℃保存	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	粉体mg×1瓶	4℃保存	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	粉体mg×1支	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 4.5mL蒸馏水溶解备用。
试剂七	液体4.2mL×1瓶	4℃保存	
标准品	粉剂mg×1支	-20℃保存	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)、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

结合态淀粉合成酶 (GBSS) 活性检测:

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、样本制备:

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
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:

上清液	300	300
试剂五	380	380
试剂六	40	40

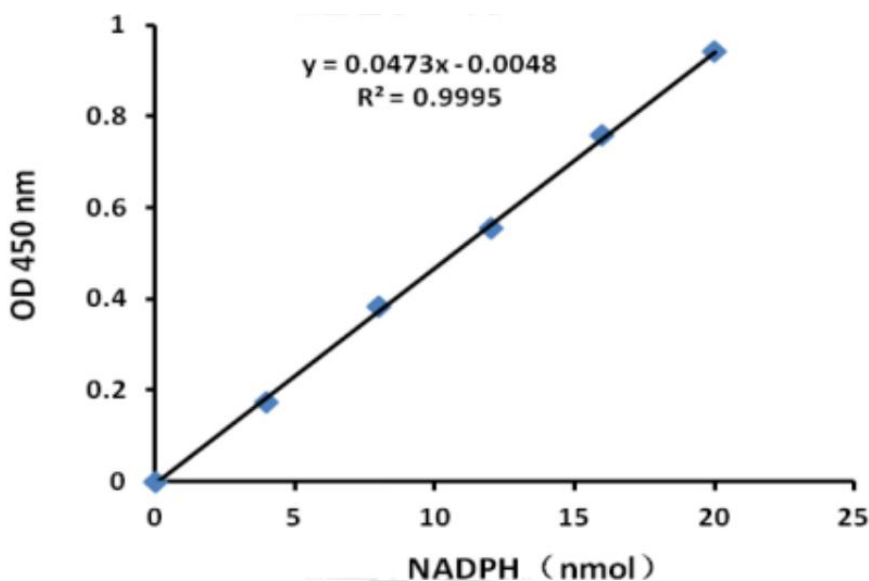


上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

试剂七	40	40
混匀, 室温(25℃)孵育15min,立即于450nm处读取吸光 值。△A=A测定-A对照(每个样本需做一个样本自身对照)。		

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。

$$\text{GBSS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0473 \times (V3 \div V2)] \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$
$$= 22 \times (\Delta A + 0.0048) \div Cpr \times D$$

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。

$$\text{GBSS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0473 \times (V3 \div V2)] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$
$$= 22 \times (\Delta A + 0.0048) \div W \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.08mL;



V2--- 上清液体积, 300 μ L;

V3---反应体系总体积, 500 μ L;

T-- 反应时间, 20min;

W---样本质量;

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/ μ L): 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 $^{\circ}$ C 保存)。

2.把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5.nmol/ μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3. 40 μ L 的标准品+680 μ L 试剂一+40 μ L 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。

源叶