



Starch Assay Kit

製品コード: T4464

使用プロトコル

比色アッセイ手順	2
蛍光アッセイ手順	3

注意:

試薬の凍結融解の繰り返しは避けてください。本キットは、研究目的に応じてさまざまな試料中のデンプンを検出できます。試料が標準曲線の範囲外にある場合は、バッファーまたは蒸留水で希釈する必要があります。

- デンプン濃度が 20~200 µg/mL の範囲(最大検出:200 µg/mL)では、比色アッセイを使用してください。
- より低濃度のデンプン(0~20 µg/mL、最大検出:20 µg/mL)の検出には、蛍光アッセイを使用してください。
- 判断に迷う場合は、まず比色アッセイから開始し、適切な段階希釈を行ったうえで、分光データをプロットして直線性を確認してください。

比色アッセイ手順

- 各構成試薬を室温に戻します。実験中は氷上または冷蔵条件で保持してください。
- 以下の希釈系列で標準曲線を作成します。

No.	Starch Standard	Assay Buffer	終濃度 (µg/mL)
1	4 µL	196 µL	200
2	3 µL	197 µL	150
3	2 µL	198 µL	100
4	1 µL	199 µL	50
5	0 µL	200 µL	0

手順:

1. 標準液 10 µL および試料 10 µL を、96 ウェルマイクロプレート of 別々のウェルに分注します。
2. 反応液(各ウェルあたり 93.5 µL)を以下のように調製します。

Enzyme I	1 µL
Enzyme II	1 µL
Enzyme Bright	1 µL
Enzyme Boost	0.5 µL
Assay Buffer	90 µL

3. 標準液および試料を含む各ウェルに反応液 90 µL を加えよく混合します。
4. 25°C で 30 分間、遮光して反応させます。
5. 550~580 nm で吸光度(OD)を測定します。

[ポジティブコントロール]

ポジティブコントロール(100 µM Biotin)を調製するには、Biotin Standard を PBS または TBS で 100 倍希釈します。ポジティブコントロールを用いて定量を行い、上記式に従ってビオチン濃度を算出し、実際の濃度 100 µM と比較します。

蛍光アッセイ手順

1. 各構成試薬を室温に戻します。実験中は氷上または冷蔵条件で保持してください。
2. Starch Standard 10 μL と Assay Buffer 90 μL を混合し、1 mg/mL Starch Standard を調製します。
3. 以下の希釈系列で標準曲線を作成します。

No.	1 mg/mL Starch Standard	Assay Buffer	終濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
1	4 μL	196 μL	20
2	3 μL	197 μL	15
3	2 μL	198 μL	10
4	1 μL	199 μL	5
5	0 μL	200 μL	0

手順:

1. 標準液 10 μL および試料 10 μL を、96 ウェルマイクロプレート of 別々のウェルに分注します。
2. 反応液(各ウェルあたり 93.5 μL)を以下のように調製します。

Enzyme I	1 μL
Enzyme II	1 μL
Enzyme Bright	1 μL
Enzyme Boost	0.5 μL
Assay Buffer	90 μL

3. 標準液および試料を含む各ウェルに反応液 90 μL を加えよく混合します。
4. 25°C で 30 分間、遮光して反応させます。
5. 蛍光(F)を Ex 520–580 nm / Em 585–595 nm で測定します。

試料中のデンプン濃度の計算:

1. 実施したアッセイに応じて、各標準液および試料の平均 OD または F を算出します。
2. ブランク(標準液 #5)の OD または F を、それ自身および他のすべての標準液から差し引き、ベースライン補正値を求めます。
3. 補正値を濃度に対してプロットし、直線的な標準曲線を作成します。その傾き(Slope)を算出します。
4. 次式によりデンプン濃度を計算します。

$$\text{Starch} = \frac{\Delta\text{OD}_{\text{sample or } \Delta\text{F}_{\text{sample}}}}{\text{Slope}} \times n (\mu\text{g/mL})$$

- $\Delta\text{OD}_{\text{sample}}$ または $\Delta\text{F}_{\text{sample}}$: 試料の吸光度または蛍光値からブランクを差し引いた値
- Slope: デンプン標準曲線の傾き

- n:希釈倍率

注:グルコースを含む試料については、Enzyme I を含まない対照群を設定する必要があります。