

淀粉分支酶 (Starch branching enzyme, SBE) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-DF010 分光法 24 样)

一、产品简介:

淀粉分支酶 (SBE, EC 2.4.1.18) 是参与支链淀粉合成的关键酶之一, 在淀粉生物合成、优质农作物品种选育和品质遗传改良研究中具有重要意义。

SBE 可使底物含量减少, 从而降低底物与碘显色剂形成的在 660nm 有最大吸收峰的蓝色复合物, 一定时间内吸光度下降的百分率可以反映 SBE 酶活性的大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 8mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 2 支	室温保存	临用前甩几下, 使试剂落入底部, 每支加 1.6mL 蒸馏水混合, 煮沸至呈现透明溶解状态, 待冷却后使用, 室温保存即可。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 1.5mL×1 支	4°C保存	

三、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、蒸馏水。

四、淀粉分支酶 (SBE) 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、样本制备:

称取约 0.1g 组织 (水分充足可适当增加样本取样质量), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 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 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 660nm, 蒸馏水调零。
- ② 试剂一和二可提前于 37 度水浴锅孵育 15-30min。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
样本	15	15	
蒸馏水		75	15
试剂一	150	150	150
试剂二	75		75
37°C孵育 10min, 沸水浴 5min, 流水冷却至室温。			
试剂三	600	600	600
试剂四	30	30	30
混匀, 显色 10min 后, 全部澄清液体 (若浑浊可离心后取上清测定) 转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 660nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$ (每个测定管需设一个对照管)。			

【注】1.若 ΔA 差值小于 0.01, 可增加样本量 V1 (如由 15μL 增至 40μL, 则试剂一相应减少)。或延长孵育时间

T (如由 10min 增至 30min 或更长), 或增加取样质量 W。则改变后的 V1 和 T 和 W 需重新代入公式计算。

2.若 A 测定和 A 对照的值接近, 说明样本中酶活性较高, 可对样本上清液用蒸馏水稀释后再测定, 则稀释倍数 D 带入公式计算。

五、结果计算:

1、按照蛋白浓度计算:

酶活定义: 以波长 660nm 的吸光度下降百分率表示, 每毫克蛋白每降低 1% 碘蓝值为一个酶活性单位。

$$\text{SBE 活性(U/mg prot)} = \Delta A / A_{\text{空白}} \times 100\% \div (V1 \times Cpr) \times D = 66.67 \times \Delta A / A_{\text{空白}} \div Cpr \times D$$

2、按照样本鲜重计算:

酶活定义: 以波长 660nm 的吸光度下降百分率表示, 每克组织每降低 1% 碘蓝值为一个酶活性单位。

$$\text{SBE 活性(U/g 鲜重)} = \Delta A / A_{\text{空白}} \times 100\% \div (W \times V1 \div V) \times D = 66.67 \times \Delta A / A_{\text{空白}} \div W \times D$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---加入样本体积, 0.015mL;

W---样本质量, g; 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。