

淀粉脱分支酶 (Starch debranching enzyme, DBE) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-DF014 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

一、产品简介:

淀粉去分支酶(DBE) (EC 3.2.1.68) 属于淀粉水解酶家族, 特异性地水解支链淀粉的 α -1, 6 糖苷键, 产生线性的葡萄糖链, 在调整支链淀粉分子的链长方面有重要的作用。

采用 3, 5-二硝基水杨酸法测定 DBE 催化支链淀粉产生的还原糖, 通过测定还原糖含量的变化来得到 DBE 酶活性大小。

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 25mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	室温保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 5.5mL 试剂一, 于 90°C水浴锅中溶解呈透明状态, 待冷却后使用, 室温保存。
试剂三	液体 26mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 8mL×1 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、所需的仪器和用品:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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:

① 组织样本: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C 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 样本(如果实样本)含有高还原糖(果糖和葡萄糖), 可按照以下步骤处理样本:

称取约 0.2g 组织(水分充足的样本可取 1g), 加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆, 4°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C 离心 5min; 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入经预冷的 85%乙醇混匀, 4°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C 离心 5min; 弃上清, 留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液, 涡旋混匀, 4°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C 离心 10min; 留上清, 弃沉淀。上清液置冰上待测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长到 540 nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂可置于 37°C 水浴中孵育 15min 左右。

③ 在 EP 管中依次加入:

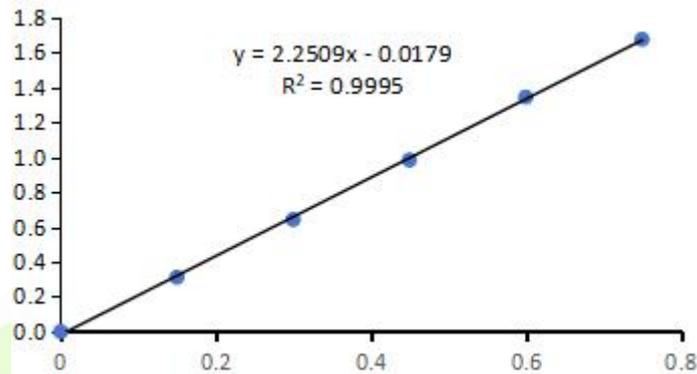
试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	30	30

试剂一	150	300
试剂二	150	
混匀后，于 37°C 孵育 30min		
试剂三	420	420
试剂四	150	150
混匀，95°C 显色 10min 后，流水冷却至室温后，全部澄清液体（如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 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管做一个自身对照）。		

【注】若 ΔA 小于 0.01，可增加样本加样量 V1（如由 30 μ L 增至 150 μ L，则试剂一相应减少）；或可加大样本量 W，或延长孵育时间 T（由 30min 增至 1 小时或更长）；则改变后的 V1 和 W 和 T 需重新代入公式计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 2.2509x - 0.0179$ ，x 是标准品质量（mg），y 是 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每小时水解支链淀粉产生 1mg 还原糖（以麦芽糖计）定义为一个酶活力单位。

$$\text{DBE 活力}(\text{mg/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0179) \div 2.2509] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 29.62 \times (\Delta A + 0.0179) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每小时水解支链淀粉产生 1mg 还原糖（以麦芽糖计）定义为一个酶活力单位。

$$\text{DBE 活力}(\text{mg/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0179) \div 2.2509] \div (W \times V1 \div V) \div T = 29.62 \times (\Delta A + 0.0179) \div W$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---反应中样品体积，30 μ L=0.03mL；

W---样品质量，g；

T---反应时间，30min=0.5h；

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 临用前加 1mL 蒸馏水，充分溶解混匀，标准品母液浓度为 50mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0,5,10,15,20, 25mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500 μ L，加入 500 μ L 蒸馏水，混匀得到 25mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	5	10	15	20	25
标品稀释液	0	40	80	120	160	200

uL						
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	30	
蒸馏水		30
试剂一	150	150
试剂二	150	150
混匀后，于 37°C 孵育 30min		
试剂三	420	420
试剂四	150	150
匀，95°C 显色 10min 后，流水冷却至室温后，全部澄清液体（如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 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		