

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

(货号: G0540F 分光法 24 样)

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℃ 保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下, 使试剂落入底部, 再加 18mL 试剂一, 于 80℃ 水浴锅中溶解呈透明状态, 待冷却后使用。
试剂三	液体 25mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 8mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

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)、可调式移液器、水浴锅、台式离心机、研钵、冰、蒸馏水

四、淀粉脱分支酶 (DBE) 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, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃ 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, 调节波长到 540 nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

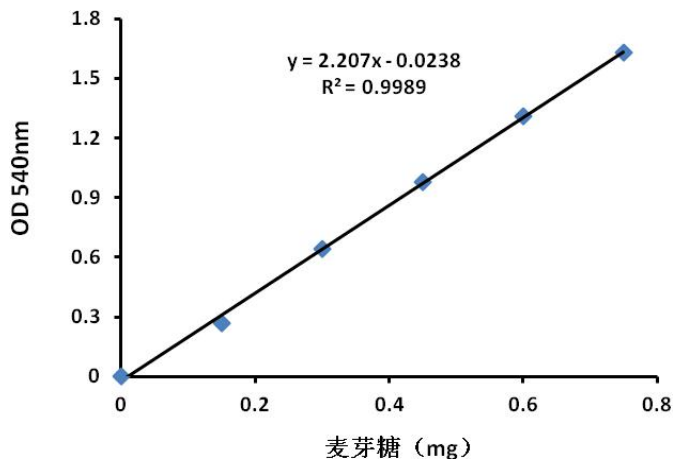
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	30	30 (95℃ 煮沸 10min 的酶液)
试剂二	300	300
37℃ 孵育 30min		
试剂三	420	420
试剂四	150	150
混匀, 95℃ 显色 10min 后, 流水冷却至室温后, 全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中, 于 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。		

【注】若 ΔA 差值较小, 可加大样本量, 或延长孵育时间至 1 小时或更长。

则改变后的加样量 V1 或反应时间 T 需重新代入公式计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y=2.207x-0.0238$ ，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。

$$\text{DBE 活力}(\text{mg/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0238) \div 2.207] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ = 30.21 \times (\Delta A + 0.0238) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{DBE 活力}(\text{mg /h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0238) \div 2.207] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 30.21 \times (\Delta A + 0.0238) \div W$$

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 制备标准品母液（50mg/mL）：临用前加 1mL 蒸馏水，充分溶解混匀。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0,5,10,15,20, 25mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照测定管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线。