

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

(货号: G0540W 微板法 48 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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	室温保存	使用前甩几下, 使试剂落入底部, 再加 6mL 试剂一, 于 90℃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 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 12mL×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:

酶标仪、96 孔板、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:

- 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℃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℃放置 10min; 12000rpm, 4℃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℃放置 10min; 12000rpm, 4℃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℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 10min; 留上清, 弃沉淀。上清液置冰上待测。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长到 540 nm。
- ② 所有试剂可置于 37℃水浴中孵育 15min 左右。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

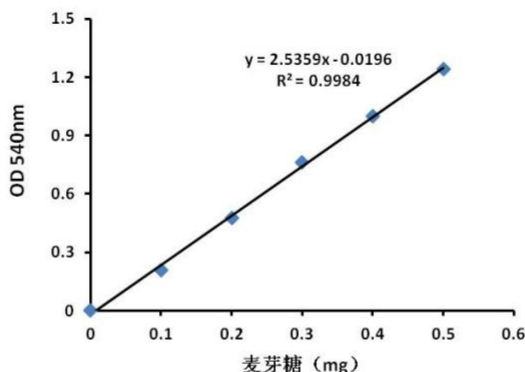
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	100	200
试剂二	100	
混匀后, 于 37℃孵育 30min		
试剂三	280	280
试剂四	100	100

混匀,95°C显色 10min 后,流水冷却至室温后,取出 200μL 澄清液体(如浑浊可离心后取上清测定)至 96 孔板中,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 20μL 增至 50μL,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: $y = 2.5359x - 0.0196$, 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。

$$\text{DBE 活力}(\text{mg/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0196) \div 2.5359] \div (V1 \times Cpr) \div T = 39.43 \times (\Delta A + 0.0196) \div Cpr$$

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。

$$\text{DBE 活力}(\text{mg/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0196) \div 2.5359] \div (W \times V1 \div V) \div T = 39.43 \times (\Delta A + 0.0196) \div W$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---反应中样品体积, 20μL=0.02mL;

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。