

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

（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 $\alpha$ -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 mg×1 瓶	室温保存	临用前甩几下，使试剂落入底部，再加 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保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C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：

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：

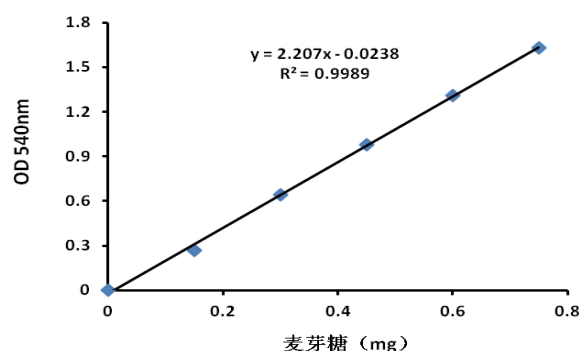
试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	对照管
样本	30	30
试剂一	150	300
试剂二	150	
混匀后，于 37°C孵育 30min		
试剂三	420	420

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  $\Delta A$  小于 0.01, 可增加样本加样量 V1 (如由 30 $\mu$ L 增至 150 $\mu$ 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:  $y = 2.207x - 0.0238$ , x 是标准品质量 (mg), y 是  $\Delta A$ 。



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 $\mu$ 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。