

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

微量法 100 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

SBE (EC 2.4.1.18) 主要存在于植物中, 是参与支链淀粉合成的关键酶, 测定 SBE 活性在淀粉生物合成、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。

测定原理

直链淀粉和碘结合后在 660nm 有特征光吸收, SBE 使直链淀粉含量减少, 从而降低了淀粉-碘复合物在 660nm 吸收值, 一定时间内吸光度下降的百分率可以反映 SBE 活性。

需自备的的仪器和用品

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰、蒸馏水

试剂的组成和配制

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 10mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×1 支, 4℃ 保存; 临用前每支加入 1mL 蒸馏水, 95℃ 沸水浴充分溶解后备用; 用不完的试剂 4℃ 保存;

试剂三: 液体 13mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂四: 液体 1mL×1 瓶, 4℃ 保存;

粗酶液提取

按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。15000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长到 660 nm, 蒸馏水调零。
- 2、加样表

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
95℃ 水浴 1min 后灭活的粗酶液	65	
粗酶液		65
试剂一	85	85
试剂二	10	10

混匀, 37℃ 准确保温 20 min, 置 95℃ 水浴中 5 min (盖紧, 防止水分散失), 冷却

试剂三	130	130
试剂四	10	10

混匀, 室温静置 10min, 取 200uL 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 660nm 处读取各管吸光值。每个测定管需设个一个对照管。

注意:

- 1、可以在不同对照管中加入不同样品的粗酶液, 然后集中进行 5min 95℃ 沸水浴处理。
- 2、试剂二如有沉淀, 务必沸水浴溶解后使用。

SBE 活力单位的计算

1、按照蛋白浓度计算

单位的定义：以波长 660nm 的吸光度下降百分率表示，每 mg 蛋白在反应体系中每降低 1% 碘蓝值为一个酶活性单位。

$$\text{SBE 活性(U/mg prot)} = (\text{A 对照管} - \text{A 测定管}) / \text{A 对照管} \div \text{Cpr} \times 100$$

2、按照样本鲜重计算

单位的定义：以波长 660nm 的吸光度下降百分率表示，每 g 组织在反应体系中每降低 1% 碘蓝值为一个酶活性单位。

$$\text{SBE 活性(U/g 鲜重)} = (\text{A 对照管} - \text{A 测定管}) / \text{A 对照管} \div (\text{W} \div \text{V 样总}) \times 100$$

V 样总：提取液总体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g。