

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

（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  $\alpha$ -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 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	4℃ 保存	临用前甩几下，使试剂落入底部，再加 24mL 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 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：

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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 540 nm。

② 在 EP 管中依次加入：

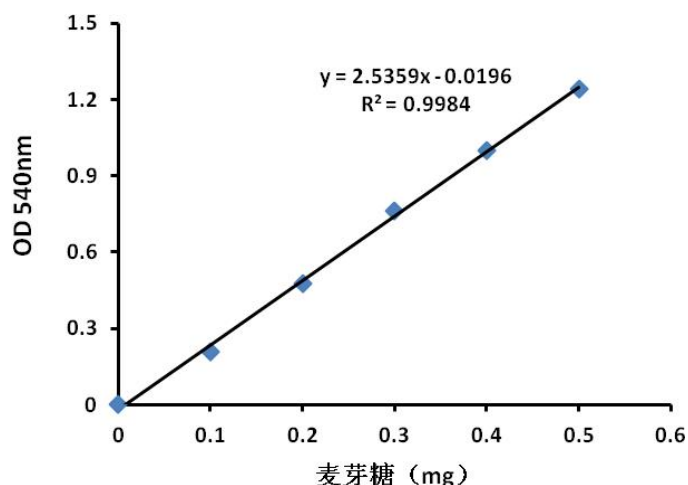
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20 (95℃ 煮沸 10min 的酶液)
试剂二	200	200
37℃ 孵育 30min		
试剂三	280	280
试剂四	100	100
混匀，95℃ 显色 10min 后，流水冷却至室温后，取出 200μL 至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。		

【注】若  $\Delta A$  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：  $y = 2.5359x - 0.0196$ ， 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。

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

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。

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

V----加入提取液体积， 1 mL； V1----反应中样品体积， 20 $\mu$ L=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。