

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

（货号：BP10298W 微板法 48 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 1 瓶	室温保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 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℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

- 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、检测步骤：

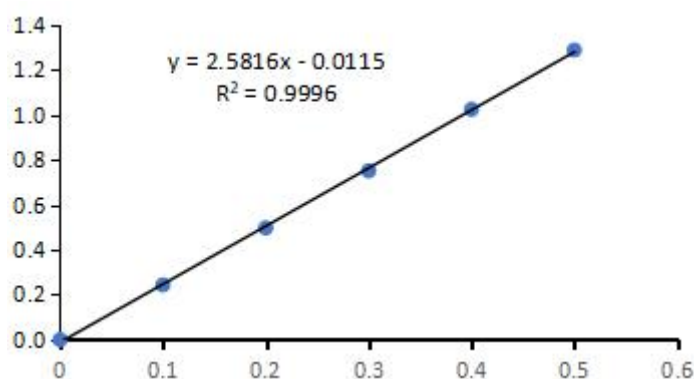
- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 540 nm。
- ② 所有试剂可置于 37℃水浴中孵育 15min 左右。
- ③ 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (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°C 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: $y = 2.5816x - 0.0115$, 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。

$$\text{DBE 活力}(\text{mg/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0115) \div 2.5816] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 38.74 \times (\Delta A + 0.0115) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{DBE 活力}(\text{mg/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0115) \div 2.5816] \div (W \times V1 \div V) \div T = 38.74 \times (\Delta A + 0.0115) \div W$$

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 临用前加 1mL 蒸馏水, 充分溶解混匀, 标准品母液浓度为 50mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 5, 10, 15, 20, 25mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 500uL, 加入 500uL 蒸馏水, 混匀得到 25mg/mL 的标品稀释液待用。

标品浓度 mg/mL	0	5	10	15	20	25
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水		20
试剂一	100	100
试剂二	100	100
混匀后，于 37°C 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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		