



淀粉脱分支酶活性检测试剂盒

DBE Assay Kit

微量法

产品编号: AK426M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES426	100mL×1 瓶	4℃保存
AK426-A	15mL×1 瓶	4℃保存
AK426-B	粉剂×1 支	4℃保存；临用前每支加入10mL AK426-A，充分混匀后备用； 剩余试剂4℃保存
AK426-C	12mL×1 瓶	4℃保存
AK426-D	35mL×1 瓶	4℃保存
AK426-标准品	粉剂×1 支	临用前加入 1 mL 蒸馏水溶解，配成 10 mg/mL 溶液；4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 淀粉脱分支酶 (Starch debranching enzyme, DBE) 能够专一性地裂解支链淀粉的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。

原理: 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计算 DBE 活性。

自备用品:

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。

粗酶液提取:

按照组织质量 (g) : ES426 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL ES426)，进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 540 nm，蒸馏水调零。
2. 将 10 mg/mL 标准液用蒸馏水稀释为 1、0.8、0.6、0.4、0.2mg/mL 的标准溶液备用。
3. 样本测定 (在 EP 管中加入下列试剂) :

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
95℃水浴 5min 后 灭活的样本	100			
粗酶液		100		
标准溶液			100	
蒸馏水				100
AK426-A	100		100	100
AK426-B		100		
混匀，37℃准确保温 2h				
AK426-C	100	100	100	100
AK426-D	300	300	300	300

混匀, 95℃水浴 5min, 取 200uL 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 540nm 处读取各管吸光值 A, 分别记为 A 对照管, A 测定管, A 标准管, A 空白管。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。每个测定管需设一个对照管 (空白管和标准曲线只需检测 1-2 次)。

注意: 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。

DBE 活力单位的计算:

1. 标准曲线的绘制:

以各个标准溶液的浓度为 x 轴, 其对应的 ΔA 标准为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y = kx + b$, 将 ΔA 带入方程得到 x (mg/mL)。

2. DBE 活性的计算:

(1) 按蛋白浓度计算

酶活定义: 每毫克蛋白每小时分解支链淀粉产生 1mg 葡萄糖为 1 个酶活力单位。

DBE 酶活 (U/mg prot) = $x \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.5x \times C_{\text{pr}}$

(2) 按样本质量计算

酶活定义: 每克样本每小时分解支链淀粉产生 1mg 葡萄糖为 1 个酶活力单位。

DBE 酶活 (U/g 质量) = $x \times V_{\text{提取}} \div W \div T = 0.5x \div W$

(3) 按细胞或细菌数量计算

酶活定义: 每 10^4 个细胞每小时分解支链淀粉产生 1mg 葡萄糖为 1 个酶活力单位。

DBE 酶活 (U/ 10^4 cell) = $x \times V_{\text{提取}} \div \text{细胞数量 (万个)} \div T = 0.5x \div \text{细胞数量 (万个)}$

(4) 按液体体积计算

酶活定义: 每 mL 样本每小时分解支链淀粉产生 1mg 葡萄糖为 1 个酶活力单位。

DBE 酶活 (U/mL) = $x \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.5x$

$V_{\text{提取}}$: 提取液体积, 1mL; $V_{\text{样}}$: 加入的样本体积, 0.1mL; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL, 蛋白浓度自行测定;

W : 样本质量, g; T : 反应时间: 2h。