

淀粉脱分支酶（Starch debranching enzyme, DBE）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：

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。

测定原理：

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。

自备仪器和样品：

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°C保存；

试剂一：液体15mL×1瓶，4°C保存；

试剂二：粉剂×1支，4°C保存；临用前每支加入6mL试剂一，充分混匀后备用；用不完的试剂4°C保存；

试剂三：液体12mL×1瓶，4°C保存；

试剂四：液体35mL×1瓶，4°C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°C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、加样表

试剂名称（ μ L）	对照管	测定管
95°C水浴5min后灭活的样本	100	
粗酶液		100
试剂一	100	
试剂二		100

混匀，37°C准确保温2h

试剂三	100	100
-----	-----	-----

试剂四	300	300
-----	-----	-----

混匀，95°C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。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设个一个对照管。

淀粉脱分支酶（Starch debranching enzyme, DBE）试剂盒说明书注意：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°C沸水浴处理。

DBE活力单位的计算

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准条件测定回归方程为 $y = 3.8458x - 0.165$ ；x为标准品浓度（mg/mL），y为吸光值。

（1）按照蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白每h催化产生1mg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{DBE活力}(\text{mg}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.165) \div 3.8458 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 0.26 \times (\Delta A + 0.165) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

（2）按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1mg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{DBE活力}(\text{mg}/\text{min}/\text{g鲜重}) &= [(\Delta A + 0.165) \div 3.8458 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.26 \times (\Delta A + 0.165) \div W \end{aligned}$$

V反总：反应体系总体积，0.2mL；V样：加入样本体积，0.1mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 h；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。

b.用96孔板测定的计算公式如下

标准条件测定回归方程为 $y = 1.9229x - 0.165$ ；x为标准品浓度（mg/mL），y为吸光值。

（1）按照蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白每h催化产生1mg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{DBE活力}(\text{mg}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.165) \div 1.9229 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 0.52 \times (\Delta A + 0.165) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

（2）按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1mg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{DBE活力}(\text{mg}/\text{min}/\text{g鲜重}) &= [(\Delta A + 0.165) \div 1.9229 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.52 \times (\Delta A + 0.165) \div W \end{aligned}$$

V反总：反应体系总体积，0.2mL；V样：加入样本体积，0.1mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 h；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。

标准曲线线性范围为0.1mg/mL-1mg/mL。

ΔA 线性范围为0.01-1。

