

淀粉脱分支酶活性检测试剂盒（微量法）

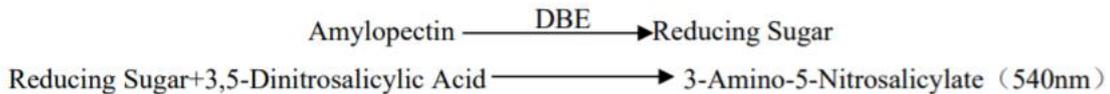
产品货号：BA1922

产品规格：100管/48样

产品简介：

淀粉脱分支酶（starch debranching enzyme, DBE）能够专一、高效的裂解支链淀粉的 α -1,6-糖苷键，对淀粉的结构起“修饰”的作用，淀粉脱分支酶在调整支链淀粉侧链的链长方面起着关键作用，淀粉分支酶和淀粉脱分支酶的平衡使得支链淀粉合成。

DBE催化支链淀粉产生还原糖，其与3,5-二硝基水杨酸反应生成棕红色物质，通过测定其在540nm下吸光值变化可计算得DBE活性。



注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体8mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×2支	2-8℃
试剂三	液体5mL×1瓶	2-8℃
试剂四	液体18mL×1瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

溶液的配制：

- 试剂二：临用前取1支加入1.5mL试剂一，充分溶解后待用，用不完的试剂2-8℃保存4周；
- 标准品：10mg无水葡萄糖。临用前加入1mL蒸馏水溶解，配成10mg/mL葡萄糖溶液备用，2-8℃可保存两周；

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式低温离心机、水浴锅或恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水、EP管。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 组织：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，然后15000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
- 细胞或细菌：按照细胞或细菌数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万个细胞或细菌加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞或细菌（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后15000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
- 液体：直接检测。（若溶液有浑浊则离心后取上清测定）

二、测定步骤

- 分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至540nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 将10mg/mL标准液用蒸馏水稀释为1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1mg/mL的标准溶液备用。

序号	稀释前浓度 (mg/mL)	标准液体积 (μ L)	蒸馏水体积 (μ L)	稀释后浓度 (mg/mL)
1	10	100	900	1
2	1	160	40	0.8



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

3	1	120	80	0.6
4	1	80	120	0.4
5	1	40	160	0.2
6	1	20	180	0.1

实验中每个标准管需40 μ L标准溶液。

- 取100 μ L样本沸水浴5min（盖紧，防止水分散失），冷却至室温后，8000g，常温离心5min，取上清备用。
- 操作表（在0.5mL或1.5mL离心管中）：

试剂名称（ μ L）	对照管	测定管	标准管	空白管
煮沸样本	40	-	-	-
样本	-	40	-	-
标准溶液	-	-	40	-
蒸馏水	-	-	-	40
试剂一	40	-	40	40
试剂二	-	40	-	-
混匀，37 $^{\circ}$ C水浴或恒温培养箱中准确反应2h				
试剂三	40	40	40	40
试剂四	120	120	120	120
混匀，沸水浴5min（盖紧，防止水分散失），取出后立即冷却至室温，测定540nm处吸光值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：37 $^{\circ}$ C水浴或恒温培养箱中反应2h后，离心管底部可能有沉淀，无需离心，直接进入下一步试验即可。

二、DBE活性计算

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。

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

（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。

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

（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。

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

（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。

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

V提取：提取液体积，1mL；V样：加入的样本体积，0.04mL；Cpr：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。

注意事项：

- A大于1.5时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定。注意同步修改计算公式。
- 建议每次实验沸水浴后冷却时间保持一致。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com