

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

(微量法 100T/48S)

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。

组成:

组分名称	SA020-100T/48S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	15ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 支	4°C
试剂三: 液体	12ml	4°C
试剂四: 液体	35ml	4°C
说明书	一份	

试剂二: 粉剂 \times 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;

自备仪器和用品:

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) : 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。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



2、加样表

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
95℃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℃准确保温 2h		
试剂三	100	100
试剂四	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。 $\Delta A = A$ 测定 - A 对照。每个测定管需设一个对照管。

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:

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。

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

$$= 0.26 \times (\Delta A + 0.165) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

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

$$= 0.26 \times (\Delta A + 0.165) \div W$$

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。

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

$$= 0.52 \times (\Delta A + 0.165) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

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

$$= 0.52 \times (\Delta A + 0.165) \div W$$

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。

