

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0997

Size: 100T/48S

淀粉脱分支酶 (DBE) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

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。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 支	4℃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℃保存
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 35mL×1 瓶	4℃保存	

五、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℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

六、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 (μL)	对照管	测定管
95℃水浴 5min 后灭活的样本	10 0	
粗酶液		100
试剂一	10 0	
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 200μL 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。

七、DBE 活力单位的计算

● 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，1mL； T：反应时间，2 h； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g。

● 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，1mL； 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。