

## 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  $\alpha$ -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。

#### 需自备的的仪器和用品

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

#### 试剂的组成和配制

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。

#### 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。

#### 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	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。每个测定管需设个一个对照管。

**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。

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

(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。

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

$V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积, 0.2mL;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.1mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1 mL;  $T$ : 反应时间, 2 h;  $\text{Cpr}$ : 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。

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

(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。

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

$V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积, 0.2mL;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.1mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1 mL;  $T$ : 反应时间, 2 h;  $\text{Cpr}$ : 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。

$\Delta A$  线性范围为 0.01-1。