

淀粉脱分支酶（DBE）检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

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（ μ L）	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 200 μ L 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。

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;

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;

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。