

使用说明书

Instruction Manual

淀粉脱分支酶活性检测试剂盒（微量法）

DBE Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

淀粉脱分支酶（Starch debranching enzyme, 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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/48S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0064M-ES	100mL×1 瓶	4℃保存。
CB0064M-A	15mL×1 瓶	4℃保存。
CB0064M-B	粉剂×1 支	4℃保存；临用前加入 10mL CB0064M-A，充分混匀后备用；剩余试剂 4℃保存。
CB0064M-C	12mL×1 瓶	4℃保存。
CB0064M-D	35mL×1 瓶	4℃保存。
CB0064M-Standard	粉剂×1 支	临用前加入 1mL 蒸馏水溶解，配成 10mg/mL 溶液；4℃保存。

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品：

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。

二、粗酶液提取：

按照组织质量（g）：提取液 CB0064M-ES 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0064M-ES），进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

三、测定步骤：

- 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。
- 将 10 mg/mL 标准液用蒸馏水稀释为 1、0.8、0.6、0.4、0.2mg/mL 的标准溶液备用。
- 样本测定（在 EP 管中加入下列试剂）：

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
95℃水浴 5min 后 灭活的样本	100			
粗酶液		100		
标准溶液			100	
蒸馏水				100
CB0064M-A	100		100	100
CB0064M-B		100		
混匀，37℃准确保温 2h。				
CB0064M-C	100	100	100	100
CB0064M-D	300	300	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 A，分别记为 A 对照管，A 测定管，A 标准管，A 空白管。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。				

- 注：** 1. 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。
2. 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）。

四、DBE 活力单位的计算：

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。

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

(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 104 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。

$$\text{DBE 酶活 (U/104 cell)} = x \times V_{\text{提取}} \div \text{细胞数量 (万个)} \div T = 0.5x \div \text{细胞数量 (万个)}$$

(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。

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

注： $V_{\text{提取}}$ ：提取液 CB0064M-ES 体积，1mL； $V_{\text{样}}$ ：加入的样本体积，0.1mL；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

- 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

