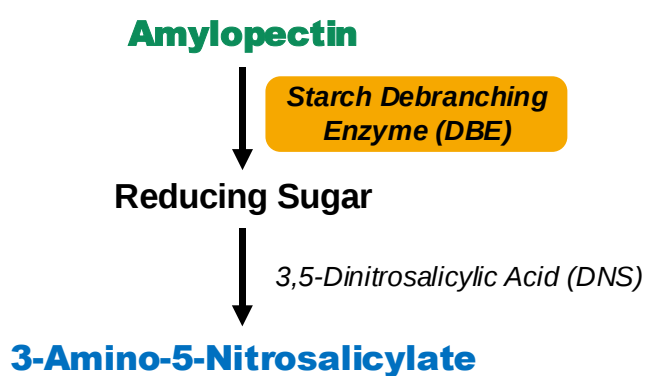




淀粉脱分支酶 (DBE) 活性检测试剂盒

Starch Debranching Enzyme (DBE) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



淀粉脱分支酶（DBE）活性检测试剂盒

Starch Debranching Enzyme (DBE) Activity Assay Kit

一、产品描述

淀粉脱分支酶（DBE）作为支链淀粉合成过程中的关键酶，能够专一性裂解支链淀粉的 α -1,6-糖苷键，对淀粉最终结构的形成起着重要作用，可通过调整支链淀粉侧链的链长赋予淀粉不同的理化特性，对于淀粉生物合成、优质农作物品种选育和品质遗传改良等方面的研究具有重要意义。

淀粉脱分支酶能够催化支链淀粉生成还原糖，进一步与 3,5-二硝基水杨酸反应生成棕红色氨基化合物，产物在 540 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值的变化即可表征淀粉脱分支酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 5 mL 试剂二充分溶解 (未使用试剂及时置于 4°C 保存)
试剂二	液体 12 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂三	液体 12 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂四	液体 25 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
标准品	粉剂×1 支 (10 mg 葡萄糖标准品)	4°C 保存	使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 10 mg/mL 葡萄糖标准液)
标准稀释液的制备：将 10 mg/mL 葡萄糖标准液使用蒸馏水稀释至 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 mg/mL 即为标准稀释液。			

序号	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 (mg/mL)	10	10	10	10	0.4	0.2
标准液体积 (μL)	100	80	60	40	500	500
蒸馏水体积 (μL)	900	920	940	960	500	500
稀释后浓度 (mg/mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③培养液等液体样本：直接检测或使用提取液适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 540 nm，蒸馏水调零。

②灭活粗酶液的制备：取适量粗酶液沸水浴处理 5 min（密封以防止水分散失），冷却至室温，12000 g 常温离心 5 min，取上清即为灭活粗酶液。

③在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
粗酶液	80	-	-	-
灭活粗酶液	-	80	-	-
标准稀释液	-	-	80	-
蒸馏水	-	-	-	80
试剂一	80	-	-	-
试剂二	-	80	80	80
充分混匀，37℃准确反应 2 h				
试剂三	80	80	80	80
充分混匀，12000 g 常温离心 5 min，取上清				
上清液	150	150	150	150
试剂四	150	150	150	150
充分混匀，沸水浴处理 5 min（密封以防止水分散失） 立即冷却至室温				

吸光值测定：吸取 200 μL 反应液至 96 孔板或微量玻璃比色皿中，测定 540 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照， ΔA 标准=A 标准-A 空白。注：空白管只需测定 1-2 次，每个样品均需设一个对照管。

标准曲线的绘制：以 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 mg/mL 标准稀释液浓度为横坐标 (x)，对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y)，得到线性回归方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中计算 x (mg/mL)。

3. 淀粉脱分支酶 (DBE) 活性计算

① 按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每小时分解支链淀粉生成 1 mg 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{DBE (U/mg prot)} = \frac{x \times V_{\text{提}}}{\text{Cpr} \times V_{\text{提}} \times T} = \frac{0.5 \times x}{\text{Cpr}}$$

② 按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每小时分解支链淀粉生成 1 mg 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{DBE (U/g)} = \frac{x \times V_{\text{提}}}{W \times T} = \frac{0.5 \times x}{W}$$

③ 按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每小时分解支链淀粉生成 1 mg 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{DBE (U/10}^4\text{ cell)} = \frac{x \times V_{\text{提}}}{\text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{0.5 \times x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④ 按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每小时分解支链淀粉生成 1 mg 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{DBE (U/mL)} = \frac{x \times D}{T} = 0.5 \times D \times x$$

注释： V 提：粗酶液总体积，1 mL；D：液体样本稀释倍数；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，2 h。

四、注意事项

- ① 试剂一配置后为悬浊状态，每次加入前应充分混匀；
- ② 若测定吸光值超出标准线性吸光值范围：高于最高值建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定，低于最低值建议适当增加样本量重新提取后再进行测定，计算时相应修改；
- ③ 沸水浴处理后应确保冷却至室温再进行吸光值测定，且各组间冷却时间应保持一致；
- ④ 为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

