

淀粉脱分支酶（DBE）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1161

保存：4℃保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞、细菌、真菌、液体样本

产品简介

淀粉脱分支酶（starch debranching enzyme, DBE）能够专一、高效的裂解支链淀粉的 α -1,6-糖苷键，产生线性的葡萄糖链，对淀粉的结构起“修饰”的作用，淀粉脱分支酶在调整支链淀粉侧链的链长方面起着关键作用，淀粉分支酶和淀粉脱分支酶的平衡使得支链淀粉合成。本试剂盒提供了一种简单的比色法来检测生物样本中 DBE 酶活性，其原理是 DBE 催化支链淀粉产生还原糖，其与 3,5-二硝基水杨酸反应生成棕红色物质，通过测定其在 540nm 下吸光值变化可计算得 DBE 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃保存
试剂一	7.5mL	15mL	4℃保存
试剂二	粉剂×1瓶	粉剂×1瓶	4℃保存
试剂三	6mL	12mL	4℃保存
试剂四	17.5mL	35mL	室温避光保存
标准品	粉剂×1支	粉剂×1支	4℃保存

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 540nm 处的吸光度）

水浴锅、离心机

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

提取液：即用型；4℃保存。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二：临用前 96T 加入 6mL 试剂一，48T 加入 3mL 试剂一，充分混匀后备用；用不完的试剂 4℃保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂四：即用型，室温避光保存。若有黄色晶体析出，需 90℃加热溶解后再用。

标准品：含 10 mg 无水葡萄糖，临用前加入 1mL 去离子水溶解得 10 mg/mL 标准品储液。10mg/mL 标准品储液可 4℃保存 1 个月或-20℃长期保存。取 40 μ L 10mg/mL 标准品储液加 360 μ L 去离子水稀释得 1mg/mL 的标准品溶液。

注意：每次实验，请使用新配制的标准品溶液。

样本制备

组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液冰浴匀浆。15,000g，4℃离心 10min，取上清置冰上代测。

产品说明书

细胞或细菌：先收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 预冷的提取液，冰浴超声波破碎细胞 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。然后 15,000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

液体样本：直接测定（若溶液有浑浊则离心后取上清测定）。建议预实验确定合适的稀释倍数。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 6 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 Bradford 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 540nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2. 取 100 μL 样本 95℃水浴 5min 作为对照管使用。
3. 样本测定（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称	空白管 (μL)	标准管 (μL)	测定管 (μL)	对照管 (μL)
去离子水	100	0	0	0
标准品溶液	0	100	0	0
样本	0	0	100	0
95℃水浴 5min 样本	0	0	0	100
试剂一	100	100	0	100
试剂二	0	0	100	0

混匀，37℃准确保温 2h

试剂三	100	100	100	100
试剂四	300	300	300	300

混匀，95℃水浴 5min，冷却，取 200 μL 至 96 孔板或微量玻璃比色皿中，测定 540nm 处的吸光值，计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ； $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。

注意：1. 每个样本需设置一个对照管，空白管和标准管只需做 1 次。

2. 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本 $A_{\text{测定}}$ 大于 2，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。若 $\Delta A_{\text{测定}}$ 小于 0.005 可以重新提取样本，适当加大样本量。

3. 可以在不同对照管中加入不同样品，然后集中进行 5min 95℃沸水浴处理。

4. 37℃水浴或恒温培养箱中反应 2h 后，离心管底部可能有沉淀，无需离心，直接进入下一步试验即可。

结果计算

DBE 酶活性计算

1. 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织在反应体系中每小时分解支链淀粉产生 1mg 葡萄糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{DBE 酶活性 (U/g 质量)} = C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times n = (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div W \times n$$

2. 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每小时分解支链淀粉产生 1mg 葡萄糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{DBE 酶活性 (U/mg prot)} = C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反应}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times n = (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div C_{\text{pr}} \times n$$

3. 按细胞或细菌数量计算

单位定义：每 10^4 个细胞在反应体系中每小时分解支链淀粉产生 1mg 葡萄糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{DBE 酶活性 (U/10}^4 \text{ cells)} = C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反应}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times n$$

$$= (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div 500 \times n = 0.002 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times n$$

4. 按液体样本体积计算

单位定义：每毫升液体样本在反应体系中每小时分解支链淀粉产生 1mg 葡萄糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{DBE 酶活性 (U/mL)} = C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}} \div T \times n = (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times n$$

产品说明书

$C_{\text{标}}$: 标准品溶液浓度, 1mg/mL; $V_{\text{反应总}}$: 反应体系总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.1mL; W : 样本质量, g; $V_{\text{样总}}$: 样本总体积, 1mL; T : 反应时间, 2h; n : 样本进一步稀释倍数; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; 500: 细菌或细胞总数, 500 万个。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验, 尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究, 如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途, 我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用, 并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用; 否则, 可能导致结果异常。
5. 勤换吸头, 避免各组分之间的交叉污染。

相关产品:

PMK1155 α -淀粉酶检测试剂盒 (微量法)
PMK1156 β -淀粉酶检测试剂盒 (微量法)
PMK1160 淀粉分支酶 (SBE) 检测试剂盒 (微量法)
PMK1164 葡萄糖检测试剂盒 (微量法)



更多产品详情了解, 请关注公众号: