

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

**产品货号: E-BC-K1206-M**

**产品规格: 96T(40 samples)**

**检测仪器: 酶标仪(530-550 nm)**

## **Elabscience®淀粉脱分支酶(DBE)比色法测试盒**

### **Starch Debranching Enzyme (DBE) Activity**

### **Colorimetric Assay Kit**

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：[biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址：[www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本测试盒适用于检测植物组织中淀粉脱分支酶(DBE)的活力。

## 检测原理

淀粉脱分支酶(Starch Debranching Enzyme, DBE)能专一性地裂解支链淀粉(Amylopectin)的 $\alpha$ -1,6糖苷键,采用3,5-二硝基水杨酸法测定生成的还原糖,通过测定其在540 nm下的吸光值变化,进而间接计算出淀粉脱分支酶的活性。

本试剂盒检测植物组织样本时,可能需测定总蛋白浓度,推荐使用考马斯亮蓝法(货号:E-BC-K168-M)。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	50 mL×2 瓶	2-8°C避光 保存6个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×2 瓶	2-8°C避光 保存6个月
试剂三 (Reagent 3)	终止剂 (Stop Solution)	8 mL×1 瓶	2-8°C避光 保存6个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	24 mL×1 瓶	2-8°C避光 保存6个月
试剂五 (Reagent 5)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	2-8°C避光 保存6个月
	96孔酶标板	1 板	
	96孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明:试剂严格按上表中的保存条件保存,不同测试盒中的试剂不能混用。

## 所需自备物品

仪器:酶标仪(530-550 nm,最佳检测波长540 nm),水浴锅,37°C恒温箱。

## 试剂准备

- ① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25°C。
- ② 样本检测前，试剂四需75°C水浴加热10 min，流水冷却至25°C后待用。
- ③ 试剂二工作液的配制：

取一瓶试剂二，向其中加入4 mL双蒸水，95°C水浴加热至完全溶解。未使用完的试剂可2-8°C保存1个月，每次使用前需95°C水浴10 min。

- ④ 10 mg/mL标准品的配制：

取一支试剂五加入1 mL双蒸水溶解，混匀后待用。未使用完的试剂可2-8°C保存1个月。

- ⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mg/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.2	1.6	2.0
10 mg/mL 标准品( $\mu$ L)	0	10	20	30	40	60	80	100
双蒸水( $\mu$ L)	500	490	480	470	460	440	420	400

## 样本准备

### ① 样本处理

#### 组织样本：

按照样本质量 (g) : 试剂一 体积 (mL) = 1: 9 的比例匀浆 (如称取 0.1 g 的组织样本, 加入 0.9 mL 的试剂一)。4°C, 15000 × g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

### ② 样本的稀释

在正式检测前, 需选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 0.9-18.0 U/g, 请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%玉米组织	2-8 倍	10%花生组织	2-4 倍

注: 稀释液为试剂一。

## 操作步骤

- ① 取部分待测样本 95°C 水浴 5 min 灭活(样本冷却后可能会有沉淀析出, 无需离心, 混匀即可)。
- ② 标准管: 取 60  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准品溶液加入相应的标准管中。  
测定管: 取 60  $\mu\text{L}$  待测样本加入相应的测定管中。  
对照管: 取 60  $\mu\text{L}$  灭活样本加入相应的对照管中。
- ③ 向步骤②中的各管加入 60  $\mu\text{L}$  试剂二工作液。
- ④ 混匀, 37°C 恒温箱中孵育 1 h。
- ⑤ 向④中各管加入 60  $\mu\text{L}$  试剂三。
- ⑥ 向⑤中各管加入 180  $\mu\text{L}$  试剂四。
- ⑦ 混匀, 95°C 水浴 5 min, 流水冷却。
- ⑧ 测定管及对照管 25°C, 15000  $\times$  g 离心 5 min。
- ⑨ 取 200  $\mu\text{L}$  上清加入酶标板孔, 540 nm 测定各孔 OD 值。(标准品不用离心, 直接取 200  $\mu\text{L}$  加入酶标板孔中)。

## 操作表

	标准管	测定管	对照管
不同浓度的标准品( $\mu\text{L}$ )	60	--	--
待测样本( $\mu\text{L}$ )	--	60	--
灭活样本( $\mu\text{L}$ )	--	--	60
试剂二工作液( $\mu\text{L}$ )	60	60	60
混匀, 37°C 恒温箱中准确孵育 1 h			
试剂三( $\mu\text{L}$ )	60	60	60
试剂四( $\mu\text{L}$ )	180	180	180
混匀, 95°C 水浴 5 min, 流水冷却			
测定管及对照管 25°C, 15000 $\times$ g 离心 5 min, 取 200 $\mu\text{L}$ 上清加入酶标板孔, 540 nm 测定各孔 OD 值。(标准品不用离心, 直接取 200 $\mu\text{L}$ 加入酶标板孔中)			

本试剂盒检测植物组织样本时, 可能需测定总蛋白浓度, 推荐使用考马斯亮蓝法。(货号: E-BC-K168-M)。

## 结果计算

标准品拟合曲线:  $y = ax + b$ .

### ① 按样本质量计算:

定义: 在 37°C 条件下, 每克组织样本每小时生成 1 mg 还原糖定义为 1 个酶活单位。

$$\text{DBE 活力} \frac{(\text{U/g})}{=} (\Delta A - b) \div a \div T \times f \div \frac{m}{V}$$

### ② 按蛋白浓度计算:

定义: 在 37°C 条件下, 每毫克组织蛋白每小时生成 1 mg 还原糖定义为 1 个酶活单位。

$$\text{DBE 活力} \frac{(\text{U/mgprot})}{=} (\Delta A - b) \div a \div T \times f \div C_{pr}$$

### 注解:

y: 标准孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

$\Delta A$ : 测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

T: 反应时间, 1 h

f: 加入检测体系前样本的稀释倍数

m: 待测样本的质量, g

V: 加入试剂一的体积, mL

$C_{pr}$ : 待测样本的蛋白质浓度, mgprot/mL

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

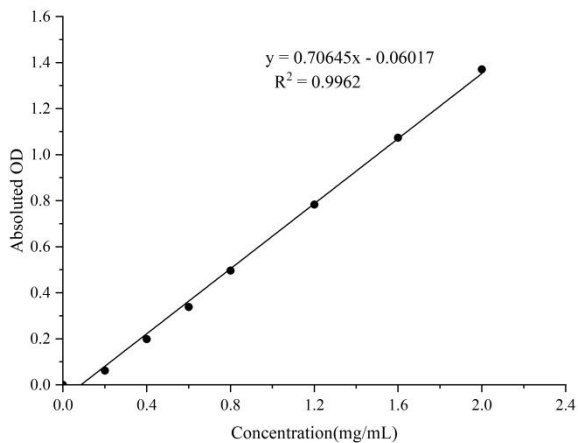
检测范围	0.9-18.0 U/g	批间差	1.0-1.4%
灵敏度	0.9 U/g	批内差	0.7-1.2%

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量60  $\mu$ L, 按照操作步骤进行实验, OD值如下表所示:

标准品浓度 (mg/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.2	1.6	2.0
OD 值	0.114	0.177	0.316	0.439	0.610	0.878	1.195	1.493
	0.114	0.175	0.310	0.465	0.611	0.916	1.180	1.476
平均 OD 值	0.114	0.176	0.313	0.452	0.611	0.897	1.188	1.485
绝对 OD 值	0.000	0.062	0.199	0.338	0.497	0.783	1.074	1.371

② 绘制标曲(如下图):



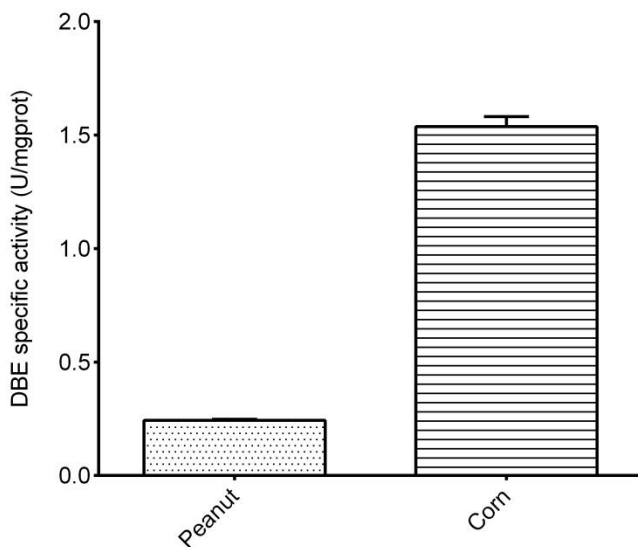
## 附录2 实例分析

例如检测花生组织(数据仅供参考):

将10%花生组织匀浆上清液稀释2倍作为待测样本,取60  $\mu\text{L}$ 待测样本及灭活样本进行检测,结果如下:标准曲线:  $y = 0.7065x - 0.0602$ , 测定孔OD值为0.566, 对照孔OD值为0.356,  $\Delta A = 0.566 - 0.356 = 0.210$ , 10%花生组织蛋白含量为3.15 mgprot/mL计算结果为:

$$\text{DBE活力 (U/mgprot)} = (0.210 + 0.0602) \div 0.7065 \div 1 \times 2 \div 3.15 = 0.24 \text{ U/mgprot}$$

按照说明书操作,测定花生组织(10%花生组织蛋白含量为3.15 mgprot/mL, 加样量60  $\mu\text{L}$ )、玉米组织(10%玉米组织蛋白含量为0.79 mgprot/mL, 加样量60  $\mu\text{L}$ )中淀粉脱分支酶(DBE)的活力。(如下图):





### 附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本 OD 值过低	稀释倍数过高	减小稀释倍数
$\Delta A$ 值过低	酶活过低	减小稀释倍数, 延长反应时间至 2 h
样本 OD 值过高	样本浓度过高	增加稀释倍数
$\Delta A$ 值过高	酶活过高	增加稀释倍数, 缩短反应时间至 0.5 h

## 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。



