

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！)

产品货号：GBQ110

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

网址：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 α -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:GBQ129)。

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℃避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×2 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	终止剂 (Stop Solution)	8 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	24 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	2-8℃避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	96 孔×1 块	无要求
	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℃恒温箱。

试剂准备

- ① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25℃。
- ② 样本检测前，试剂四需75℃水浴加热10 min，流水冷却至25℃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℃水浴加热至完全溶解。未使用完的试剂可2-8℃保存1个月，每次使用前需95℃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℃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(μL)	0	10	20	30	40	60	80	100
双蒸水(μL)	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℃，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℃ 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 μL 不同浓度的标准品溶液加入相应的标准管中。
测定管：取 60 μL 待测样本加入相应的测定管中。
对照管：取 60 μL 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 μL 试剂二工作液。
- ④ 混匀，37℃ 恒温箱中孵育 1 h。
- ⑤ 向④中各管加入 60 μL 试剂三。
- ⑥ 向⑤中各管加入 180 μL 试剂四。
- ⑦ 混匀，95℃ 水浴 5 min，流水冷却。
- ⑧ 测定管及对照管 25℃，15000 × g 离心 5 min。
- ⑨ 取 200 μL 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 μL 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(μL)	60	--	--
待测样本(μL)	--	60	--
灭活样本(μL)	--	--	60
试剂二工作液(μL)	60	60	60
混匀，37℃ 恒温箱中准确孵育 1 h			
试剂三(μL)	60	60	60
试剂四(μL)	180	180	180
混匀，95℃ 水浴 5 min，流水冷却			
测定管及对照管 25℃，15000 × g 离心 5 min，取 200 μL 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 μL 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：GBQ129)。

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

ΔA : 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

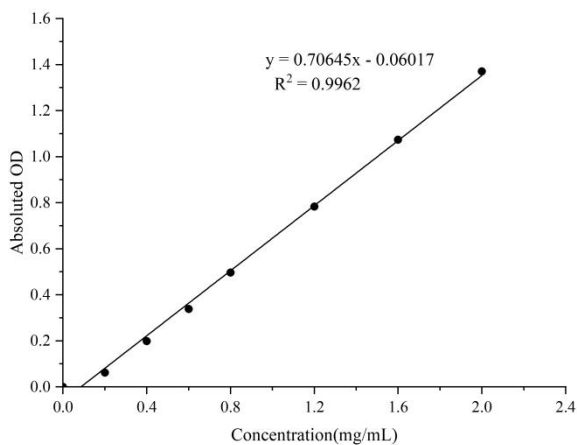
检测范围	0.9-18.0 U/g	批间差	1.0-1.4%
灵敏度	0.9 U/g	批内差	0.7-1.2%

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量60 μ 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):



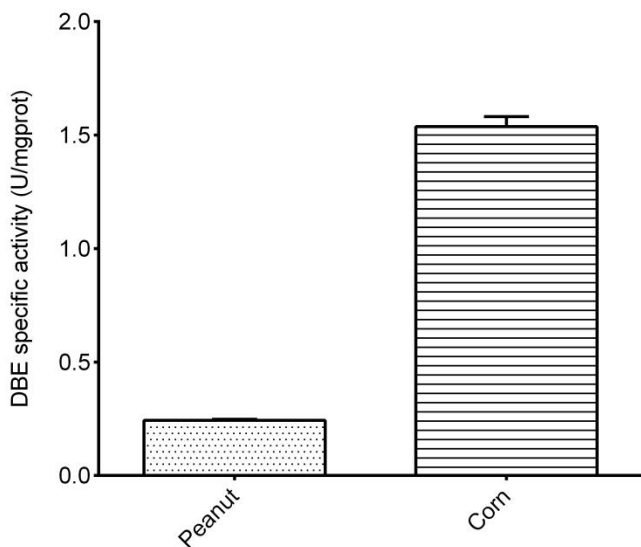
附录2 实例分析

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 μL 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 μL)、玉米组织(10%玉米组织蛋白含量为0.79 mgprot/mL,加样量60 μL)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
ΔA 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
ΔA 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。

