

淀粉分支酶（SBE）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：AC10353

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 25 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×2 支	4°C保存
试剂三	液体 25 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 1 mL 蒸馏水，缓慢加热，逐渐升温至沸腾，使其充分溶解，备用。

产品说明：

SBE（EC 2.4.1.18）主要存在于植物中，是参与支链淀粉合成的关键酶，测定 SBE 活性在淀粉生物合成、优质农作物品种选育和品质遗传改良研究中具有重要意义。

淀粉和碘结合后在 660nm 有特征光吸收，SBE 可切断支链淀粉侧支，从而降低了淀粉-碘复合物在 660nm 吸收值，一定时间内吸光度下降的百分率可以反映 SBE 活性。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰、蒸馏水。

操作步骤：**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

称取约 0.1g 组织加入 1mL 提取液，冰浴中匀浆。15000g，4°C离心 15min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至660nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定：

试剂名称（ μL ）	对照管	测定管
煮沸1min后灭活的样本	250	
样本		250
试剂一	320	320
试剂二	30	30
混匀，37°C准确保温20min，置沸水浴中1min终止反应（盖紧防止水分散失），冷却		
试剂三	500	500
试剂四	100	100

混匀，室温静置 10min，用蒸馏水调零，660nm 处读取各管吸光值。

注意：若有样本浑浊，建议离心后取上清测定。

三、SBE 活力单位计算

1、按照蛋白浓度计算

单位的定义：以波长 660nm 的吸光度下降百分率表示，每 mg 蛋白在 1mL 反应体系中每分钟降低 1%碘蓝值为一个酶活性单位。

$$\text{SBE 活性(U/mg prot)} = (A \text{ 对照管} - A \text{ 测定管}) \div A \text{ 对照管} \times 100\% \div 1\% \div (Cpr \times V \text{ 样本}) \times V \text{ 反应} \div T \\ = 24 \times (A \text{ 对照管} - A \text{ 测定管}) \div A \text{ 对照管} \div Cpr$$

2、按照样本质量计算

单位的定义：以波长 660nm 的吸光度下降百分率表示，每 g 组织在 1mL 反应体系中每分钟降低 1%碘蓝值为一个酶活性单位。

$$\text{SBE 活性(U/g 质量)} = (A \text{ 对照管} - A \text{ 测定管}) \div A \text{ 对照管} \times 100\% \div 1\% \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样本}) \times V \text{ 反应} \div T \\ = (A \text{ 对照管} - A \text{ 测定管}) \div A \text{ 对照管} \div W \times 24$$

V 样本: 加入样本体积, 0.25mL; V 提取: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; V 反应: 反应体系体积, 1.2mL; T: 反应时间, 20min。

注意事项：

- 1、可以在不同对照管中加入不同的样本，然后集中进行 1min 沸水浴处理。
- 2、试剂一如有沉淀，加入之前要使之充分溶解混匀。

实验实例：

1. 取约 0.1g 桃树叶加入 1mL 提取液，冰浴中匀浆。15000g，4°C离心 15min，取上清置冰上，之后按照测定步骤操作，测得计算 A 对照管=0.649，A 测定管=0.399，按样本质量计算酶活得：

$$\text{SBE 活性(U/g 质量)} = (A \text{ 对照管} - A \text{ 测定管}) \div A \text{ 对照管} \div W \times 24 = 92.45 \text{ U/g 质量。}$$

相关发表文献：

[1] Peitong Wang Xi Chen Xuan Xu, et al. Arsenate induced chlorosis 1/ translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts 132 protects chloroplasts from Arsenic Toxicity. Plant physiology. October 2018;(IF6.305)

参考文献：

[1] Jiang H, Dian W, Wu P. Effect of high temperature on fine structure of amylopectin in rice endosperm by reducing the activity of the starch branching enzyme[J]. Phytochemistry, 2003, 63(1): 53-59.