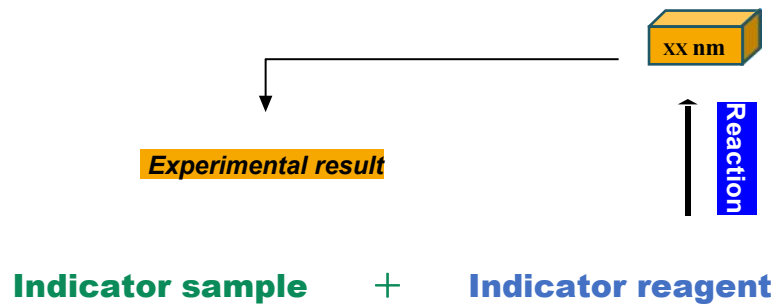


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

β-淀粉酶（β-AL）活性检测试剂盒说明书 可见分光光度法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

产品说明：

淀粉酶负责水解淀粉，主要包括α-淀粉酶和β-淀粉酶。β-淀粉酶(EC 3.2.1.2) 从淀粉的非还原端切开α-1,4糖苷键，生成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、糊精等还原糖。

还原糖还原3,5-二硝基水杨酸生成棕红色物质。α-淀粉酶不耐酸，β-淀粉酶不耐热。根据上述特性，钝化其中之一，就可测出另一种淀粉酶的活力。

试验中所需的仪器和试剂：

可见分光光度计、恒温水浴锅、离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 65mL×1 瓶	4℃保存	若有黄色晶体析出，需加热溶解后再用
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 35mL 蒸馏水，置于常温水中并加热至煮沸，期间不断搅拌粉剂至溶解。
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	10mg 无水葡萄糖

操作步骤：

一、样品中可溶性糖的提取：

称取约 0.1g 样本，加入 0.8mL 蒸馏水，研磨匀浆；将匀浆倒入离心管中，提取液在室温下放置提取 15min，每 5min 振荡 1 次，使其充分提取；6000g，常温离心 10min，取上清液加蒸馏水定容至 10 mL，摇匀，即淀粉酶原液。吸取上述淀粉酶原液 1mL，加入 4mL 双蒸水，摇匀，即为淀粉酶稀释液，用于(α+β)淀粉酶总活力的测定。

二、测定操作表：

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。
- 2、将葡萄糖标准液稀释为 0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0.0078 和 0.0039mg/mL 的标准溶液。

3、按操作表依次加入各试剂：

试剂名称 (μL)	α -淀粉酶活力测定		总淀粉酶活力测定		标准曲线的测定	
	对照管	测定管	对照管	测定管	空白管	标准管
淀粉酶原液	250	250	-	-	-	-
蒸馏水	-	-	-	-	250	-
标准溶液	-	-	-	-	-	250

70°C水浴 15min 左右，冷却

淀粉酶稀释液	-	-	250	250	-	-
--------	---	---	-----	-----	---	---

试剂一	-	-	-	-
试剂二	250	250	-	-

在 40°C恒温水浴中准确保温 5min

试剂一	500	500	500	500	500	500
试剂二	250	250	250	250	250	250

混匀，90°C水浴 10min，在 540nm 下测定吸光度，从左到右分别记为 A1、A2、A3、A4、A5 和 A6，计算 $\Delta A_{\alpha} = A2 - A1$ ， $\Delta A_{\text{总}} = A4 - A3$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A6 - A5$ 。

酶活性计算：

1、标准曲线的绘制

以 $\Delta A_{\text{标准}}$ 为 y 轴，以标准溶液浓度为 x 轴，绘制标准曲线，得到方程 $y = kx + b$ 。将 ΔA_{α} 测定带入方程得到 x_1 (mg/mL)， $\Delta A_{\text{总}}$ 代入方程得到 x_2 (mg/mL)。

2、 α -淀粉酶活性

a. 按照样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性 (mg/g 鲜重)} = x_1 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2 \times x_1 \div W$$

b. 按照蛋白质含量计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性 (mg/mg prot)} = x_1 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.2 \times$$

$x_1 \div C_{\text{pr}}$ 3、总淀粉酶活性计算

(1) 按照样品质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。总

$$\text{淀粉酶活性 (mg/g 鲜重)} = 5 \times x_2 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 10 \times x_2 \div W$$

(2) 按照蛋白质含量计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。总淀粉酶活性

$$\text{(mg/mg prot)} = 5 \times x_2 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = x_2 \div C_{\text{pr}}$$

4、 β -淀粉酶活性计算

(1) 按照样品质量计算

单位定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。 β -淀粉酶活性 (U/g 鲜重) = 淀粉酶总活性 - α -淀粉酶活性 = $(10 \times x_2 \div W) - (2 \times x_1 \div W)$
 $= (10 \times x_2 - 2 \times x_1) \div W$

(2) 按照蛋白质含量计算

单位定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。 β -淀粉酶活性 (U/mg prot) = 淀粉酶总活性 - α -淀粉酶活性
 $= (x_2 \div Cpr) - (0.2 \times x_1 \div Cpr)$ 5: 总淀粉酶稀释倍数, (4mL+1mL)

/1mL=5; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.25 mL; V 样总: 提取液总体积, 10 mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; T: 反应时间, 5min。

注意事项

测定的吸光值大于 1 时, 可以对样本进行适当稀释后测定。