

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0501

Size: 100T/48S

β-淀粉酶 (β-AL) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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。

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、离心机、可调式移液器、96 孔板/微量玻璃比色皿、研钵和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 35mL × 1 瓶	常温保存	若有黄色晶体析出, 需加热溶解后再用;
试剂二	粉剂 × 1 瓶	4°C 保存	临用前加入 20mL 蒸馏水, 置于常温水并加热至煮沸, 期间不断搅拌粉剂至溶解。
标准品	粉剂 × 1 支	4°C 保存	10mg 无水葡萄糖

五、操作步骤:

● 粗酶液提取:

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。

● 测定步骤:

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长到 540 nm, 蒸馏水调零。
- 2、将葡萄糖用蒸馏水稀释为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0.0078 和 0.0039mg/mL 的标准溶液。
- 3、测定操作表:

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	标准管	空白管
淀粉酶原液	75	75			-	-
蒸馏水					-	75
标准溶液					75	-
70°C水浴 15min 左右, 冷却						
淀粉酶稀释液			75	75	-	-
试剂一					-	-
试剂二		75		75		
于 40°C恒温水浴中准确保温 5min						
试剂一	150	150	150	150	150	150
试剂二	75	0	75		75	75

混匀, 90°C水浴 10min, 取 200 μL 至 96 孔板或微量玻璃比色皿中, 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 $\Delta A_{\alpha} = A2 - A1$, $\Delta A_{总} = A4 - A3$, $\Delta A_{标准} = A6 - A5$ 。

六、酶活性计算:

1、标准曲线的绘制

以 $\Delta A_{标准}$ 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) $\Delta A_{总}$ 代入方程得到 x_2 (mg/mL)

2、 α -淀粉酶活性的计算

(1) 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。

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

(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 个酶活性单位。

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

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。

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

(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。

$$\text{总淀粉酶活性 (U/mg prot)} = 5 \times x_2 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = x_2 \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\begin{aligned} \beta\text{-淀粉酶活性 (U/g 鲜重)} &= \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} = (10 \times x_2 \div W) - (2 \times x_1 \div W) \\ &= (10 \times x_2 - 2 \times x_1) \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\beta\text{-淀粉酶活性 (U/mg prot)} = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} = (x_2 \div C_{\text{pr}}) - (0.2 \times x_1 \div C_{\text{pr}})$$

5: 总淀粉酶稀释倍数; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.075 mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液总体积,

10 mL; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; T : 反应时间, 5min。

七、注意事项：

测定的吸光值大于 1.5 时，可以对样本进行适当稀释后测定。