

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-S0782

Size: 50T/24S

β -淀粉酶检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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、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。

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 65mL $\times$ 1 瓶	4°C 保存	若有黄色晶体析出，需加热溶解后再用
试剂二	粉剂 $\times$ 1 瓶	4°C 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 $\times$ 1 支	4°C 保存	10mg 无水葡萄糖

五、操作步骤：

● 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（ $\alpha + \beta$ ）淀粉酶总活力的测定。

● 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（ μ L）	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℃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℃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

混匀，90℃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 $\Delta A_{\alpha} = A2 - A1$ ， $\Delta A_{总} = A4 - A3$ ， $\Delta A_{标准} = A6 - A5$ 。

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

● 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。

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

● 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。

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

3、总淀粉酶活性计算

● 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。

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

● 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。

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

4、 β -淀粉酶活性计算

- 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。

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

- 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。

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

5：总淀粉酶稀释倍数， $(4\text{mL}+1\text{mL})/1\text{mL}=5$ ； 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。

七、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。