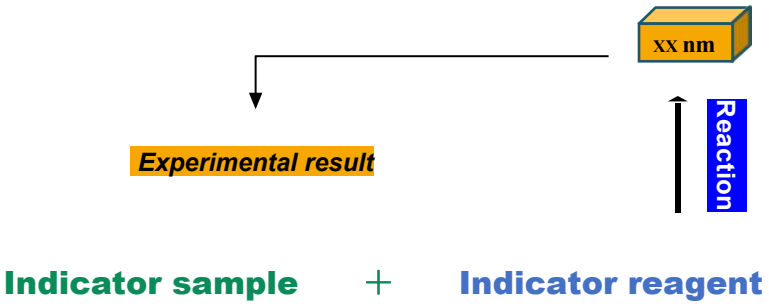
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0501　　规格：100管/48样

β-淀粉酶（β-AL）活性检测试剂盒说明书
微量法

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。

产品内容：

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℃保存	临用前加入 20mL 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

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。

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。

操作步骤：

一、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。

二、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℃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℃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℃水浴 10min，取 200μL 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ΔAα=A2-A1，ΔA 总=A4-A3，ΔA 标准=A6-A5。**三、酶活性计算：**

1、标准曲线的绘制

以ΔA 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ΔAα测定带入方程得到 x_1（mg/mL），ΔA 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。

α-淀粉酶活性(U/g 鲜重)=x_1×V 样÷(W×V 样÷V 样总)÷T =2×x_1÷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。

α-淀粉酶活性(U/mg prot)=x_1×V 样÷（V 样×Cpr）÷T = 0.2×x_1÷Cpr

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。

总淀粉酶活性(U/g 鲜重)=5×x_2×V 样÷(W×V 样÷V 样总)÷T=10×x_2÷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(U/mg prot)= 5×x_2×V 样÷（V 样×Cpr）÷T = x_2 ÷Cpr

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； V 样：加入反应体系中样本体积，0.075 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 1.5 时，可以对样本进行适当稀释后测定。