

β-淀粉酶(β-AL)检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-DF003-48 微板法 48 样)

有效期: 3 个月

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)可随机地作用于淀粉中的α-1,4-糖苷键, 生成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、糊精等还原糖。

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。

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、微量石英比色皿/96 孔板、研钵和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

试剂一: 30mL×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: 15mL×1 瓶, 4℃ 保存。

粗酶液提取:

1、组织样本:

称取约 0.1g 样本, 加 1mL 蒸馏水匀浆; 匀浆后在室温下放置提取 15min, 每隔 5min 振荡 1 次, 使其充分提取; 8000g, 常温离心 10min, 吸取上清液即为淀粉酶原液。

吸取上述淀粉酶原液 0.1mL, 加入 0.4mL 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。

2、细菌、细胞样本:

收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 在室温下放置提取 20min, 每隔 5min 振荡 1 次, 使其充分提取; 8000g, 4℃ 离心 10min, 上清液置冰上待测。

吸取上述淀粉酶原液 0.1mL, 加入 0.4mL 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。

3、液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

测定步骤:

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长到 540 nm, 蒸馏水调零。

2、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	
	对照管	测定管	对照管	测定管
淀粉酶原液	75	75		
70℃ 水浴 15min 左右, 冷却				
淀粉酶稀释液			75	75
试剂二		75		75
蒸馏水	75		75	
将以上对照管、测定管于 40℃ 恒温水浴中保温 5min				
试剂一	150	150	150	150

混匀, 沸水浴 5min, 取 200 μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 540nm 处读取吸光值, 从

左到右分别记为 A1、A2、A3 和 A4。

酶活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准条件下测定回归曲线为 $y=3.7215x-0.1778$ ； x 为标准品浓度 (mg/mL)， y 为吸光值。

1、 α -淀粉酶活性

(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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(mg/min/g 鲜重)}=[(A2-A1+0.1778)\div 3.7215\times V\text{ 反总}]\div(W\times V\text{ 样}\div V\text{ 样总})\div T$$

$$=0.1075\times(A2-A1+0.1778)\div W$$

(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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(mg/min/mg prot)}=[(A2-A1+0.1778)\div 3.7215\times V\text{ 反总}]\div(V\text{ 样}\times Cpr)\div T$$

$$=0.1075\times(A2-A1+0.1778)\div Cpr$$

(3) 按照液体体积计算

单位定义：每 mL 液体每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(mg/min/mL)}=[(A2-A1+0.1778)\div 3.7215\times V\text{ 反总}]\div V\text{ 样}\div T$$

$$=0.1075\times(A2-A1+0.1778)$$

(4) 按照细菌、细胞个数计算

单位定义：每 1 万个细胞、组织每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(mg/min/10}^4\text{ cell)}=[(\Delta A+0.1778)\div 3.7215\times V\text{ 反总}]\div(500\times V\text{ 样}\div V\text{ 样总})\div T$$

$$=0.000215\times(\Delta A+0.1778)$$

V 反总：反应体系总体积，0.15mL； 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，1mL； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g； T：反应时间，5min； 500：细菌或细胞总数，500 万。

2、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。

$$\text{总淀粉酶活性(mg/min//g 鲜重)}=5\times[(A4-A3+0.1778)\div 3.7215\times V\text{ 反总}]\div(W\times V\text{ 样}\div V\text{ 样总})\div T$$

$$=0.5375\times(A4-A3+0.1778)\div W$$

(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

$$\text{酶活性(mg/min/mg prot)}=5\times[(A4-A3+0.1778)\div 3.7215\times V\text{ 反总}]\div(V\text{ 样}\times Cpr)\div T$$

$$=0.5375\times(A4-A3+0.1778)\div Cpr$$

(3) 按照液体体积计算

单位定义：每 mL 液体每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\text{总淀粉酶活性(mg/min/mL)}=5\times[(A4-A3+0.1778)\div 3.7215\times V\text{ 反总}]\div V\text{ 样}\div T$$

$$=0.5375\times(A4-A3+0.1778)$$

(4) 按照细菌、细胞个数计算

单位定义：每 1 万个细胞、组织每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(mg/min/10}^4\text{ cell)}=5\times[(\Delta A+0.1778)\div 3.7215\times V\text{ 反总}]\div(500\times V\text{ 样}\div V\text{ 样总})\div T$$

$$=0.001075\times(\Delta A+0.1778)$$

V 反总：反应体系总体积，0.15mL； 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，1mL； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g； T：反应时间，5min； 500：细菌或细胞总数，500 万； 5：稀释倍数。

3、β-淀粉酶活性计算

(1) 按照样本质量计算

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。

$$\beta\text{-淀粉酶活性 (mg/min/g 鲜重)} = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} \\ = [0.5375 \times (A4 - A3 + 0.1778) - 0.1075 \times (A2 - A1 + 0.1778)] \div W$$

(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。

$$\beta\text{-淀粉酶活性 (mg/min/mg prot)} = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} \\ = [0.5375 \times (A4 - A3 + 0.1778) - 0.1075 \times (A2 - A1 + 0.1778)] \div \text{Cpr}$$

(3) 按照液体体积计算

单位定义：每 mL 液体每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\beta\text{-淀粉酶活性 (mg/min/mL)} = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} \\ = 0.5375 \times (A4 - A3 + 0.1778) - 0.1075 \times (A2 - A1 + 0.1778)$$

(4) 按照细菌、细胞个数计算

单位定义：每 1 万个细胞、组织每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位

$$\beta\text{-淀粉酶活性 (mg/min/10}^4\text{ cell)} = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} \\ = 0.001075 \times (\Delta A + 0.1778) - 0.000215 \times (\Delta A + 0.1778)$$

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定回归曲线为 $y = 2.481x - 0.1778$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

1、α-淀粉酶活性

(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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性 (mg/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 0.1612 \times (\Delta A + 0.1778) \div W$$

(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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性 (mg/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 0.1612 \times (\Delta A + 0.1778) \div \text{Cpr}$$

(3) 按照液体体积计算

单位定义：每 mL 液体每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性 (mg/min/mL)} = [(\Delta A + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T \\ = 0.1612 \times (\Delta A + 0.1778)$$

(4) 按照细菌、细胞个数计算

单位定义：每 1 万个细胞、组织每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性 (mg/min/10}^4\text{ cell)} = [(\Delta A + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 0.000322 \times (\Delta A + 0.1778)$$

V 反总：反应体系总体积, 0.15mL; 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, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 5min; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

2、总淀粉酶活性计算

(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。

$$\text{总淀粉酶活性 (mg/min/g 鲜重)} = 5 \times [(A4 - A3 + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$=0.806 \times (\Delta A + 0.1778) \div W$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{总淀粉酶活性 (mg/min/mg prot)} &= 5 \times [(A4 - A3 + 0.1778) \div 2.481 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 0.806 \times (A4 - A3 + 0.1778) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(3) 按照液体体积计算

单位定义：每 mL 液体每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{总淀粉酶活性 (mg/min/mL)} &= 5 \times [(A4 - A3 + 0.1778) \div 2.481 \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \div T \\ &= 0.806 \times (A4 - A3 + 0.1778) \end{aligned}$$

(4) 按照细菌、细胞个数计算

单位定义：每 1 万个细胞、组织每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-淀粉酶活性 (mg/min/10}^4 \text{ cell)} &= 5 \times [(\Delta A + 0.1778) \div 2.481 \times V \text{ 反总}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 0.00161 \times (\Delta A + 0.1778) \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，0.15mL；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，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，5min；500：细菌或细胞总数，500 万；5：稀释倍数。

3、β-淀粉酶活性计算

(1) 按照样本质量计算

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。

$$\begin{aligned} \beta\text{-淀粉酶活性 (mg/min/g 鲜重)} &= \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} \\ &= [0.806 \times (A4 - A3 + 0.1778) - 0.1612 \times (A2 - A1 + 0.1778)] \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \beta\text{-淀粉酶活性 (mg/min/mg prot)} &= \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} \\ &= [0.806 \times (A4 - A3 + 0.1778) - 0.1612 \times (A2 - A1 + 0.1778)] \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(3) 按照液体体积计算

单位定义：每 mL 液体每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \beta\text{-淀粉酶活性 (mg/min/mL)} &= \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} \\ &= 0.806 \times (A4 - A3 + 0.1778) - 0.1612 \times (A2 - A1 + 0.1778) \end{aligned}$$

(4) 按照细菌、细胞个数计算

单位定义：每 1 万个细胞、组织每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位

$$\begin{aligned} \beta\text{-淀粉酶活性 (mg/min/10}^4 \text{ cell)} &= \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} \\ &= 0.00161 \times (\Delta A + 0.1778) - 0.000322 \times (\Delta A + 0.1778) \end{aligned}$$

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。