

β-淀粉酶 (β-amylase, β-AL) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-DF003 微板法 48 样)

一、产品简介:

淀粉酶包括α-淀粉酶 (EC 3.2.1.1) 和β-淀粉酶 (EC 3.2.1.2)。淀粉酶催化淀粉水解生成还原糖, 是生物体利用淀粉进行碳水化合物代谢的初级反应。生成的还原糖能使 3,5-二硝基水杨酸生成棕红色得 3-氨基-5-硝基水杨酸, 在 540 nm 有吸收峰; 通过测定 540 nm 吸光度增加速率, 计算淀粉酶活性。

本试剂盒采用 70°C 加热钝化β-淀粉酶测出α-淀粉酶的活力, 再与非钝化条件下测定的总活力 (α+β) 相比较, 求出β-淀粉酶的活性。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉体 1 瓶	4°C 保存	临用前用试剂一于 80°C 水浴溶解, 并定容至 10mL。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵和蒸馏水。

四、β-淀粉酶 (β-AL) 活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本: 称取约 0.2g 组织 (水分充足的样本可取 1g), 加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆, 4°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C 离心 5min; 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入经预冷的 1mL 的 80% 乙醇混匀, 4°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C 离心 5min; 弃上清, 留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液, 涡旋混匀, 4°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C 离心 10min; 留上清, 弃沉淀。上清液置冰上待测。即为淀粉酶原液(酶液 I), 用于α-淀粉酶测定。

上述淀粉酶原液稀释 5 倍 (如吸取 0.1mL 淀粉酶原液+0.4mL 蒸馏水混匀), 即为总淀粉酶稀释液 (酶液 II), 用于 (α+β) 淀粉酶总活力的测定。

② 细菌/培养细胞: 先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; 12000rpm, 4°C 离心 10min, 上清液置冰上待测。即为淀粉酶原液(酶液 I), 用于α-淀粉酶测定。

吸取上述淀粉酶原液 1mL, 加入 4mL 蒸馏水, 摇匀, 即为总淀粉酶稀释液 (酶液 II), 用于 (α+β) 淀粉酶总活力的测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500:1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长到 540 nm。

② 试剂二 40°C 预热 10min, 在 EP 管中依次加入:

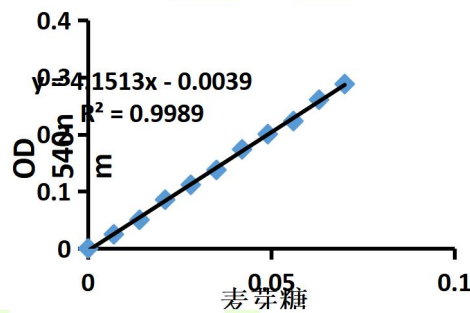
试剂名称 (μL)	总淀粉酶活力测定		α-淀粉酶活力测定	
	测定管	对照管	测定管	对照管
酶液 I			70	70

70°C水浴 15min 钝化, 冷却				
酶液 II	70	70		
蒸馏水		70		70
试剂二	70		70	
40°C恒温水浴中准确保温 5min				
试剂三	140	140	140	140
混匀, 95 度水浴 5min, 流水冷却, 取 200μL 至 96 孔板中, 540nm 处读取吸光值 A, 从左到右分别记为 A1、A2、A3 和 A4。ΔA _总 = (A1-A2) ; ΔA _{α-淀粉酶} = (A3-A4) 。【注】: 每个测定管需设一个对照管。				

- 【注】1. 若ΔA 在零附近如低于 0.005, 可增加样本取样质量 W, 或增加样本加样量 V1 (如由 70μL 增至 100μL, 则试剂三相应减少, 保持总体积不变), 或延长反应时间 T (如由 5min 增至 20min), 则改变后的 W 和 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。
2. 若ΔA 值大于 1, 则可减少加样体积 V1 (如由 70μL 减至 20μL, 另补加 50μL 蒸馏水), 或单独对各个上清液用蒸馏水稀释后再取 70μL 加样测定。则改变后的 V1 和稀释倍数 D 代入重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 4.1513x - 0.0039$; x 为标准品质量 (mg), y 为吸光值 ΔA。



2、总淀粉酶活性计算:

(1) 按照样本质量计算:

单位定义: 每克组织每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= 5 \times [(\Delta A_{\text{总}} + 0.0039) \div 4.1513 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 3441.3 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0039) \div W \times D \end{aligned}$$

(2) 按照蛋白质含量计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= 5 \times [(\Delta A_{\text{总}} + 0.0039) \div 4.1513 \times 10^3] \div (V1 \div V \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 3441.3 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0039) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

(3) 按细菌/细胞密度计算:

单位定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{总淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= 5 \times [(\Delta A_{\text{总}} + 0.0039) \div 4.1513 \times 10^3] \div (V1 \div V \times 500) \div T \times D \\ &= 3441.3 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0039) \div 500 \times D \end{aligned}$$

(4) 液体样本中总淀粉酶活性计算:

单位定义: 每毫升液体每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{总淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= 5 \times [(\Delta A_{\text{总}} + 0.0039) \div 4.1513 \times 10^3] \div V1 \div T \times D \\ &= 3441.3 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0039) \times D \end{aligned}$$

3、α-淀粉酶活性计算:

(1) 按照样本质量计算:

单位定义: 每克组织每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \div 4.1513 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$=688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \div W \times D$$

(2) 按照蛋白质含量计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot})=[(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \div 4.1513 \times 10^3] \div (V1 \div V \times Cpr) \div T \times D$$

$$=688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \div Cpr \times D$$

(3) 按细菌/细胞密度计算:

单位定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \div 4.1513 \times 10^3] \div (V1 \div V \times 500) \div T \times D$$

$$=688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \div 500 \times D$$

(4) 液体样本中 α -淀粉酶活性计算:

单位定义: 每毫升每分钟催化产生 1 μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL})=[(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \div 4.1513 \times 10^3] \div V1 \div T \times D$$

$$=688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \times D$$

4、 β -淀粉酶活性计算:

(1) 按照样本质量计算:

单位定义: 每克组织在反应体系中每分钟催化产生 1 μg 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\beta\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重})=\text{淀粉酶总活性}-\alpha\text{-淀粉酶活性}$$

$$=[3441.3 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0039) - 688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039)] \div W \times D$$

(2) 按照蛋白质含量计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 μg 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\beta\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot})=\text{淀粉酶总活性}-\alpha\text{-淀粉酶活性}$$

$$=[3441.3 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0039) - 688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039)] \div Cpr \times D$$

(3) 按细菌/细胞密度计算:

单位定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\beta\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=\text{淀粉酶总活性}-\alpha\text{-淀粉酶活性}$$

$$=[3441.3 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0039) - 688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039)] \div 500 \times D$$

(4) 液体样本中 β -淀粉酶活性计算:

单位定义: 每毫升液体每分钟催化产生 1 μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\beta\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL})=\text{淀粉酶总活性}-\alpha\text{-淀粉酶活性}$$

$$=[3441.3 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0039) - 688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039)] \times D$$

5---总淀粉酶稀释倍数; V1---加入反应体系中样本体积, 70 μL = 0.07 mL;

V---提取液总体积, 1 mL; W---样本质量, g; 500---细菌或细胞总数, 万;

T---反应时间, 5min; D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。
- 3 70 μL 标准品+70 μL 蒸馏水+140 μL 试剂三, 混匀, 95 度水浴 5min, 流水冷却, 取 200 μL 至 96 孔板中, 540nm 处读取吸光值, 以标准品质量为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 即可制作标准曲线。