

# β-淀粉酶检测试剂盒

(货号: BC090 50 管/24 样)

正式实验前, 请取 2 例样本进行预试, 以调整样本适宜浓度。

## 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。

## 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、仪器设备 (自备):

可见分光光度计 (或酶标仪540nm)、恒温水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵和蒸馏水。

## 四、试剂组成: (试剂盒有效期 6 个月)

**试剂一:** 底物液, 30mL×1 瓶, 常温保存。

**试剂二:** 显色液, 60mL×1 瓶, 4℃保存。

**试剂三:** 糖标准液, 2mL×1 瓶 (浓度1mg/mL), 4℃保存。(不做标准曲线只测标准管时可以1:3加蒸馏水配成0.25mg/mL标准应用液, 用多少配多少)

## 五、操作步骤:

### 1、粗酶液提取:

**组织:** 称取0.1~0.2g样本 (建议称取约0.1g 样本), 加入1mL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; 3000g, 常温离心10min, 取上清液0.5mL加蒸馏水2mL混合, 摇匀, 即**淀粉酶原液**, 用于α淀粉酶活力的测定; 吸取上述淀粉酶原液0.5mL, 加入4.5mL 蒸馏水(10倍稀释), 混匀, 即为**淀粉酶稀释液**, 用于 (α+β) 淀粉酶总活力的测定。

**血清 (浆) 等液体样本:** ①直接检测α淀粉酶活力 ②吸取样本0.5mL, 加入4.5mL蒸馏水, 混匀, 即为**淀粉酶稀释液**, 用于 (α+β) 淀粉酶总活力的测定。

### 2、操作表:

试剂名称	α-淀粉酶		总淀粉酶		空白管	标准管
	测定管 (A1)	对照管 (A2)	测定管 (A3)	对照管 (A4)		
淀粉酶原液 (μL)	250	250				
	70℃水浴 15min 左右, 冷却					
淀粉酶稀释液 (μL)			250	250		
蒸馏水 (μL)					500	250
0.25mg/mL 标准液 (μL)						250
试剂一 (μL)	250		250			
40℃恒温准确水浴 5min						
试剂二 (μL)	500	500	500	500	500	500
试剂一 (μL)		250		250		
混匀, 95℃水浴 5min, 波长 540nm, 1cm 光径比色皿, 测定各管吸光度值。						
(从左往右依次为 A1、A2、A3、A4)						

## 六、单位定义与计算公式：

### 1、组织淀粉酶活性：

#### (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。

$$\alpha - \text{淀粉酶活力} \left( \frac{\text{U}}{\text{g组织}} \right) = \frac{A1 - A2}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}} \div (W \div V_{\text{提}} \div 5 \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$\text{总淀粉酶活力} \left( \frac{\text{U}}{\text{g组织}} \right) = \frac{A3 - A4}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}} \div (W \div V_{\text{提}} \div 5 \times V_{\text{样}}) \div T \times 10$$

$$\beta - \text{淀粉酶活力} \left( \frac{\text{U}}{\text{g组织}} \right) = \text{总淀粉酶活力} - (\alpha - \text{淀粉酶活力})$$

#### (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。

$$\alpha - \text{淀粉酶活力} \left( \frac{\text{U}}{\text{mgprot}} \right) = \frac{A1 - A2}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$\text{总淀粉酶活力} \left( \frac{\text{U}}{\text{mgprot}} \right) = \frac{A3 - A4}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 10$$

$$\beta - \text{淀粉酶活力} \left( \frac{\text{U}}{\text{mgprot}} \right) = \text{总淀粉酶活力} - (\alpha - \text{淀粉酶活力})$$

### 2、血清（浆）等液体样本淀粉酶活性计算：

单位定义：每毫升样本每分钟催化产生1mg 还原糖定义为1 个酶活力单位。

$$\alpha - \text{淀粉酶活力} \left( \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{A1 - A2}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}} \div V_{\text{样}} \div T$$

$$\text{总淀粉酶活力} \left( \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{A3 - A4}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10$$

$$\beta - \text{淀粉酶活力} \left( \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \text{总淀粉酶活力} - (\alpha - \text{淀粉酶活力})$$

【注】 $C_{\text{标准}}$ ：标准液浓度，0.25mg/mL；

$V_{\text{标准}}$ ：标准液加入量，0.25mL；

$V_{\text{样}}$ ：反应时样本加入量，0.25mL；

$V_{\text{提}}$ ：提取液体积，1mL；

$W$ ：样本质量，g；

$T$ ：反应时间，5min；

$C_{\text{pr}}$ ：淀粉酶原液蛋白浓度，mgprot/mL（prot指蛋白），测蛋白试剂盒本公司有售(A045-2或A045-3/-4)；

5：制作淀粉酶原液时的稀释倍数；

10：总淀粉酶测试前的稀释倍数（如果样本总淀粉酶活力较高，可适当扩大这个稀释倍数，反之亦可减少稀释倍数）。

### 七、计算举例：

称取0.1004g小麦粉（市售），按前处理步骤处理，按照操作表操作，测得A1为0.634，A2为0.227，A3为0.556，A4为0.120，空白管OD值为0.047，标准管OD值为0.644，则计算如下：

$$\alpha - \text{淀粉酶活力} \left( \frac{\text{U}}{\text{g组织}} \right) = \frac{0.634 - 0.227}{0.644 - 0.047} \times 0.25 \times 0.25 \div (0.1004 \div 1 \div 5 \times 0.25) \div 5$$

$$= 2.144 \text{U/g组织}$$

$$\text{总淀粉酶活力} \left( \frac{\text{U}}{\text{g组织}} \right) = \frac{0.556 - 0.120}{0.644 - 0.047} \times 0.25 \times 0.25 \div (0.1004 \div 1 \div 5 \times 0.25) \div 5 \times 10$$

$$= 18.185 \text{U/g组织}$$

$$\beta - \text{淀粉酶活力} \left( \frac{\text{U}}{\text{g组织}} \right) = 18.185 - 2.144 = 16.041 \text{U/g组织}$$

#### 八、注意事项：

- 1、本法用酶标仪测定时，不能直接在孔板中反应，而是要在管中反应完后，取0.2mL反应液到96孔板上，540nm处读数；
- 2、试剂一保存时会有固体析出，使用前需70°C溶解后才可使用；
- 3、不同的样本淀粉酶活力不同（就如市售的面粉，不同时间、不同品种间差异也比较大），所以一定要做好预实验，保证实验结果。

## 附录:标准曲线制作

### 一、试剂准备:

将1mg/mL的糖标准液，用蒸馏水稀释成0.5mg/mL、0.25mg/mL、0.1mg/mL、0.05mg/mL几个浓度，按照操作表操作。

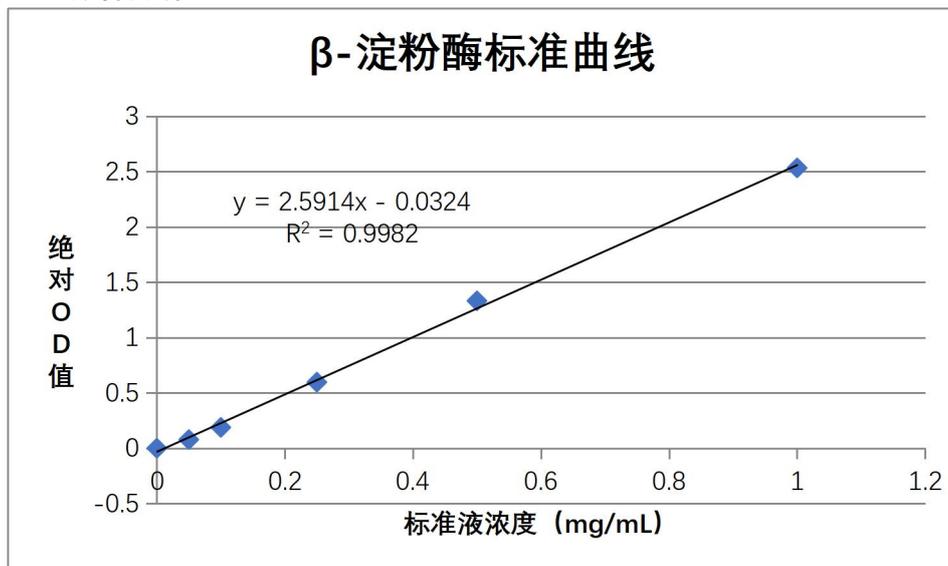
### 二、操作步骤:

试剂名称	空白管	标准管
蒸馏水 (μL)	500	250
不同浓度糖标准液 (μL)		250
40°C 恒温水浴 5min		
试剂二 (μL)	500	500
混匀，95°C水浴 5min，波长 540nm，1cm 光径比色皿，测定各管吸光度值 A。		

### 三、测定结果:

标准液浓度 (mg/mL)	0	0.05	0.1	0.25	0.5	1
OD 值	0.047	0.125	0.235	0.644	1.379	2.581
绝对 OD 值	0	0.078	0.188	0.597	1.332	2.534

### 四、拟合曲线:



(标准曲线可以不做，而是做第一页操作表中的空白标准管，按计算公式计算即可)