

β-淀粉酶 (β-amylase, β-AL) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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、恒温水浴锅、离心机、可调式移液器、玻璃比色皿、研钵和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

试剂一: 50mL×1 瓶, 常温保存, 若有黄色晶体析出, 需 90℃加热溶解后再用;

试剂二: 40mL×1 瓶, 4℃保存, 若有沉淀析出, 需 70℃加热后再用。

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, 25℃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 蒸馏水, 摇匀, 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。(2) 吸取淀粉酶原液 1mL, 加入 4mL 蒸馏水, 摇匀, 即为淀粉酶稀释液, 用于 (α+β) 淀粉酶总活力的测定。

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、试剂一和试剂二 40℃预热 10min。

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	
	对照管	测定管	对照管	测定管
淀粉酶原液	250	250		

70℃水浴 15min 左右, 冷却

淀粉酶稀释液			250	250
蒸馏水	250		250	
试剂二		250		250

在 40℃恒温水浴中准确保温 5min

试剂一	500	500	500	500
-----	-----	-----	-----	-----

混匀, 95℃水浴 5min, 冷却, 在 540nm 下测定吸光度, 从左到右分别记为 A1、A2、A3 和 A4。

酶活性计算:

1、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。

2、α-淀粉酶活性

订购电话: 0512-62956165 技术支持: 18015581827 投诉电话: 18112525205

(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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(A2-A1 + 0.1778) \div 3.7215 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 1.075 \times (A2-A1 + 0.1778) \div W$$

(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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(A2-A1 + 0.1778) \div 3.7215 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 0.1075 \times (A2-A1 + 0.1778) \div \text{Cpr}$$

(3) 血清（浆）等液体样本中 α -淀粉酶活性计算

单位定义：每 mL 血清（浆）每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mL}) = [(A2-A1 + 0.1778) \div 3.7215 \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \div T = 0.1075 \times (A2-A1 + 0.1778)$$

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。

$$\text{总淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = 5 \times [(A4-A3 + 0.1778) \div 3.7215 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 5.375 \times (A4-A3 + 0.1778) \div W$$

(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。

$$\text{总淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mg prot}) = 5 \times [(A4-A3 + 0.1778) \div 3.7215 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 0.5375 \times (A4-A3 + 0.1778) \div \text{Cpr}$$

(3) 血清（浆）等液体样本中总淀粉酶活性计算

单位定义：每 mL 血清（浆）每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\text{总淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mL}) = 5 \times [(A4-A3 + 0.1778) \div 3.7215 \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \div T \\ = 0.5375 \times (A4-A3 + 0.1778)$$

4、 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。

$$\beta\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} = [5.375 \times (A4-A3 + 0.1778) - 1.075 \times (A2-A1 + 0.1778)] \div W$$

(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。

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

(3) 血清（浆）等液体样本中 β -淀粉酶活性计算

单位定义：每 mL 血清（浆）每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活性单位。

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

5: 总淀粉酶稀释倍数; V 反总: 反应体系总体积, 0.5mL; 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。