

β-淀粉酶检测试剂盒说明书(精简版)

(货号: C016-2-1, β-Amylase Kit, β-AL 50管/24样)

正式实验前,请抽取2例样本进行预试,以确定样本最佳取样浓度。

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3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。

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

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

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

(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。

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

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

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

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。

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

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

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

【注】C_{标准}:标准液浓度,0.25mg/mL;

V_{标准}:标准液加入量,0.25mL;

V_样:反应时样本加入量,0.25mL;

V_提:提取液体积,1mL;

W:样本质量,g;

T:反应时间,5min;

Cpr: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、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℃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。

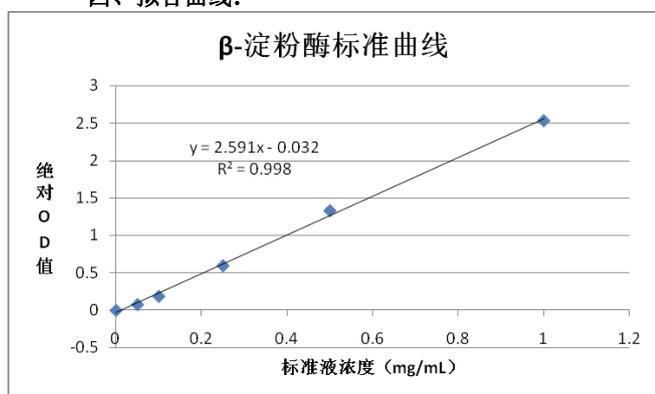
二、操作步骤:

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℃恒温水浴 5min		
试剂二 (μL)	500	500
混匀, 95℃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:



(标准曲线可以不做制作第一页操作表中的空白标准管,按计算公式计算即可)