

## β-淀粉酶（β-amylase, β-AL）试剂盒说明书

（微板法 48 样） 一、产品简介：

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℃ 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℃ 保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前用试剂一于 80℃ 水浴溶解，并定容至 10mL。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃ 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℃ 放置 10min；12000rpm，4℃ 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℃ 放置 10min；12000rpm，4℃ 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℃ 放置 10min；12000rpm，4℃ 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℃ 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（10<sup>4</sup>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℃ 预热 10min，在 EP 管中依次加入：

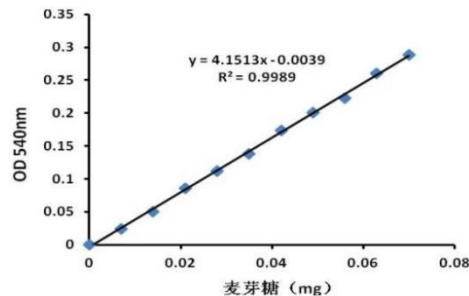
试剂名称 (μL)	总淀粉酶活力测定		α-淀粉酶活力测定	
	测定管	对照管	测定管	对照管
酶液 I			70	70
70℃水浴 15min 钝化, 冷却				
酶液 II	70	70		
蒸馏水		70		70
试剂二	70		70	
40℃恒温水浴中准确保温 5min				
试剂三	140	140	140	140
混匀, 95度水浴 5min, 流水冷却, 取 200μL 至 96 孔板中, 540nm 处读取吸光值 A, 从左到右分别记为 A1、A2、A3 和 A4。ΔA <sub>总</sub> = (A1-A2); ΔA <sub>α-淀粉酶</sub> = (A3-A4)。【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 为标准品浓度 (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 个酶活力单位。

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

(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 个酶活力单位。

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

3、 $\alpha$ -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  $1\mu\text{g}$  麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}}+0.0039)\div 4.1513\times 10^3]\div (W\times V_1\div V)\div T\times D$$

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

(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  $1\mu\text{g}$  麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot})=[(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}}+0.0039)\div 4.1513\times 10^3]\div (V_1\div V\times \text{Cpr})\div T\times D$$

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

(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  $1\mu\text{g}$  麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}}+0.0039)\div 4.1513\times 10^3]\div (V_1\div V\times 500)\div T\times D$$

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

(4) 液体样本中 $\alpha$ -淀粉酶活性计算:单位定义: 每毫升每分钟催化产生  $1\mu\text{g}$  麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL})=[(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}}+0.0039)\div 4.1513\times 10^3]\div V_1\div T\times D$$

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

4、 $\beta$ -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  $1\mu\text{g}$  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  $1\mu\text{g}$  麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

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

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

(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  $1\mu\text{g}$  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 $\beta$ -淀粉酶活性计算:单位定义: 每毫升液体每分钟催化产生  $1\mu\text{g}$  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:  $V_1$ ---加入反应体系中样本体积,  $70\mu\text{L}$   
=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 ( $1\text{mg}/\text{mL}$ ): 向标准品 EP 管里面加入  $1\text{mL}$  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  $70\mu\text{L}$  标准品+ $70\mu\text{L}$  蒸馏水+ $140\mu\text{L}$  试剂三, 混匀,  $95^\circ\text{C}$  水浴 5min, 流水冷却, 取  $200\mu\text{L}$  至 96 孔板中,  $540\text{nm}$  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。