

β -Amylase Activity Assay Kit

β -淀粉酶 (β -AL) 试剂盒说明书

货号: G0511W | 方法: 微板法 | 规格: 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 ($\alpha+\beta$) 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 mg×1 瓶	4°C 保存	临用前加 10mL 的试剂一, 混匀后于 90-95°C 水浴溶解, 中间若有损失最终可用试剂一定容至 10mL。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂 mg×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, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

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 ($\alpha+\beta$) 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 ($\alpha+\beta$) 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 (10^4 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：

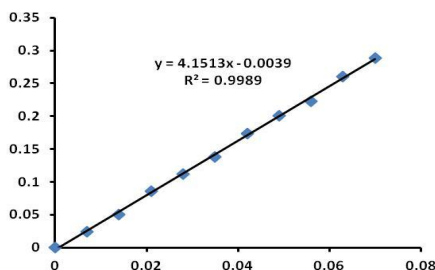
- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 540 nm。
- ② 试剂二 40°C 预热 10min，在 EP 管中依次加入：

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。△A _总 = (A1-A2)； △A _{α-淀粉酶} = (A3-A4)。【注】：每个测定管需设一个对照管。				

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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 △A。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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 1 μg 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 1 μg 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g} \text{ 鲜重}) &= [(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \div 4.1513 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \div W \times D \end{aligned}$$

(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 1 μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg} \text{ prot}) &= [(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \div 4.1513 \times 10^3] \div (V1 \div V \times Cpr) \div T \times D \\ &= 688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

(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 1 μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \div 4.1513 \times 10^3] \div (V1 \div V \times 500) \div T \times D \\ &= 688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \div 500 \times D \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \div 4.1513 \times 10^3] \div V1 \div T \times D \\ &= 688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039) \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \beta\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g} \text{ 鲜重}) &= \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} \\ &= [3441.3 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0039) - 688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039)] \div W \times D \end{aligned}$$

(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 1 μg 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \beta\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg} \text{ prot}) &= \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} \\ &= [3441.3 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0039) - 688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0039)] \div Cpr \times D \end{aligned}$$

(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 1 μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

β -淀粉酶活性($\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}$)=淀粉酶总活性- α -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 $1\mu\text{g}$ 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

β -淀粉酶活性($\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}$)=淀粉酶总活性- α -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, $70\mu\text{L} = 0.07 \text{ mL}$;

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, 5 min ;

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。