



β -淀粉酶 (β -AL) 活性检测试剂盒 (碘-淀粉比色法) 说明书

可见分光光度法

货号: BC4580

规格: 50T/24S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	粉剂×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 20mL×1 支	4℃保存
试剂三	液体 40mL×1 瓶	4℃保存
标准品	粉剂×1 瓶	4℃保存

溶液的配制:

- 1、试剂一: 临用前取 1 瓶加入 20mL 试剂三, 置于常温水中并加热至煮沸, 期间不断搅拌粉剂至溶解, 用不完的试剂 4℃保存 8 周;
- 2、标准品: 10 mg 淀粉标准品。临用前加 10 mL 试剂三, 置沸水浴中振荡溶解, 配成 1 mg/mL 淀粉标准液。

产品说明:

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) 从淀粉的非还原端切开 α -1,4 糖苷键, 生成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、糊精等还原糖。

碘可以与未被淀粉酶水解的淀粉结合, 生成在 570nm 下有特征吸收峰的复合物, 其深浅可计算出淀粉酶的活力单位。 α -AL 不耐酸, β -AL 不耐热。根据上述特性, 钝化其中之一, 就可测得另一种活性。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1、组织: 称取约 0.1g 样本, 加 1mL 蒸馏水匀浆; 匀浆后在室温下放置提取 15min, 每隔 5min 振荡 1 次, 使其充分提取; 6000g, 常温离心 10min, 吸取上清液即为淀粉酶原液。

2、液体: 直接检测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热30min以上, 调节波长至570nm, 蒸馏水调零。

2、将淀粉标准液用蒸馏水稀释为0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.0015625mg/mL的标准溶液。

3、按操作表依次加入各试剂:

试剂名称 (μL)	α-淀粉酶活力测定		总淀粉酶活力测定		空白管 5	标准曲线的测定	
	测定管 1	对照管 2	测定管 3	对照管 4		标准管 6	标准空白管 7
样本	250	250	-	-	-	-	-
蒸馏水	-	-	-	-	250	-	250
标准溶液	-	-	-	-	-	250	-
70℃水浴 15min 左右, 冷却							
样本	-	-	250	250	-	-	-
试剂一	250	-	250	-	250	-	-
蒸馏水	-	250	-	250	-	250	250
于 40℃恒温水浴中准确保温 5min							
试剂二	125	125	125	125	125	125	125
蒸馏水	375	375	375	375	375	375	375

混匀后于1mL玻璃比色皿中测定570nm下的吸光度, 从左到右分别记为A1、A2、A3、A4、A5、A6和A7, 计算 $\Delta A_{\alpha} = A_5 - (A_1 - A_2)$, $\Delta A_{\text{总}} = A_5 - (A_3 - A_4)$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_6 - A_7$ 。空白管、标准曲线只需做1-2次。

三、β-淀粉酶活性计算

1、标准曲线的绘制

以 ΔA 标准为 y 轴, 以标准溶液浓度为 x 轴, 绘制标准曲线, 得到方程 $y = kx + b$ 。将 ΔA_{α} 测定带入方程得到 x_1 (mg/mL), ΔA 总代入方程得到 x_2 (mg/mL)。

2、α-淀粉酶活性的计算

(1) 按照样本质量计算

单位定义: 每g组织每分钟消耗1mg 淀粉定义为1个酶活力单位。

α -淀粉酶活性(U/g 质量) = $x_1 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.2 \times x_1 \div W$

(2) 按照蛋白质浓度计算

单位定义: 每mg组织蛋白每分钟消耗1mg淀粉定义为1个酶活性单位。

α -淀粉酶活性(U/mg prot) = $x_1 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.2 \times x_1 \div C_{\text{pr}}$

(3) 按液体体积计算:

单位定义: 每mL液体每分钟消耗1mg淀粉定义为1个酶活性单位。

α -淀粉酶活性(U/mL) = $x_1 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.2 \times x_1$

V样: 加入反应体系中样本体积, 0.25mL; V样总: 样本总体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 5min。

3、总淀粉酶活性的计算

(1) 按照样本质量计算

单位定义: 每g组织每分钟消耗1mg 淀粉定义为1个酶活力单位。

总淀粉酶活性(U/g 质量) = $x_2 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.2 \times x_2 \div W$

(2) 按照蛋白质浓度计算

单位定义: 每mg组织蛋白每分钟消耗1mg淀粉定义为1个酶活性单位。

总淀粉酶活性(U/mg prot) = $x_2 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.2 \times x_2 \div C_{\text{pr}}$

(3) 按液体体积计算

单位定义：每mL液体每分钟消耗1mg淀粉定义为1个酶活性单位。

总淀粉酶活性(U/mL)= $x_2 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \div T = 0.2 \times x_2$

V样：加入反应体系中样本体积，0.25mL；V样总：样本总体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，5min。

4、β-淀粉酶活性的计算

(1) 按照样本质量计算

单位定义：每g组织每分钟消耗1mg 淀粉定义为1个酶活力单位。

β-淀粉酶活性(U/g 质量)=淀粉酶总活性-α-淀粉酶活性= $0.2 \times x_2 \div W - 0.2 \times x_1 \div W$

(2) 按照蛋白质浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟消耗1mg淀粉定义为1个酶活性单位。

β-淀粉酶活性(U/mg prot)=淀粉酶总活性-α-淀粉酶活性= $0.2 \times x_2 \div Cpr - 0.2 \times x_1 \div Cpr$

(3) 按液体体积计算

单位定义：每mL液体每分钟消耗1mg淀粉定义为1个酶活性单位。

β-淀粉酶活性(U/mL)=淀粉酶总活性-α-淀粉酶活性= $0.2 \times x_2 - 0.2 \times x_1$

注意事项：

吸光值大于1.5或者ΔA大于0.8时，可以对样本进行适当稀释后测定。

相关系列产品：

BC4570/BC4575 α-淀粉酶（α-AL）活性检测试剂盒（碘-淀粉比色法）

