

## β-淀粉酶（β-amylase, β-AL）试剂盒说明书

微量法 100管/48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。

### 测定意义：

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。

### 自备仪器和样品：

可见分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：30mL×1瓶，常温保存，若有黄色晶体析出，需90°C加热溶解后再用；

试剂二：15mL×1瓶，4°C保存，若出现沉淀析出，需70°C加热溶解后再用。

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°C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、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长到540 nm，蒸馏水调零。

2、试剂一和试剂二40°C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    | 75       | 75  |          |     |

70°C水浴15min左右，冷却

|        |  |  |    |    |
|--------|--|--|----|----|
| 淀粉酶稀释液 |  |  | 75 | 75 |
|--------|--|--|----|----|

|     |    |    |    |    |
|-----|----|----|----|----|
| 蒸馏水 | 75 |    | 75 |    |
| 试剂二 |    | 75 |    | 75 |

40°C恒温水浴中准确保温5min

|     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| 试剂一 | 150 | 150 | 150 | 150 |
|-----|-----|-----|-----|-----|

混匀，95度水浴5min，冷却，取200μL至微量石英比色皿或96孔板中，540nm处读取吸光值，从左到右分别记为A1、A2、A3和A4。每个测定管需设一个对照管。

### β-淀粉酶（β-amylase, β-AL）试剂盒说明书酶活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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

（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。

α淀粉酶活性(mg/min/g鲜重)=[(A2-A1+0.1778)÷3.7215×V反总]÷(W×V样÷V样总)÷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。

α淀粉酶活性(mg/min/mg prot)=[(A2-A1+0.1778)÷3.7215×V反总]÷(V样×Cpr)÷T

$$=0.1075 \times (A2-A1+0.1778) \div Cpr$$

（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。

α淀粉酶活性(mg/min/mL)=[(A2-A1+0.1778)÷3.7215×V反总]÷V样÷T=0.1075×(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。

总淀粉酶活性(mg/min/g鲜重)=5×[(A4-A3+0.1778)÷3.7215×V反总]÷(W×V样÷V样总)÷T=5.375×(A4-A3+0.1778)÷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。

总淀粉酶活性(mg/min/mg prot)=5×[(A4-A3+0.1778)÷3.7215×V反总]÷(V样×Cpr)÷T

$$=0.5375 \times (A4-A3+0.1778) \div Cpr$$

（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。

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

#### 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。

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

##### (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。

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

##### (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个酶活力单位。

$$\beta\text{-淀粉酶活性 (mg/min/mL)} = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} = 0.5375 \times (A4 - A3 + 0.1778) - 1.075 \times (A2 - A1 + 0.1778)$$

5：总淀粉酶稀释倍数；V反总：反应体系总体积，0.15mL；V样：加入反应体系中样本体积，0.075 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。

#### b.用96孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归曲线为 $y = 2.481x - 0.1778$ ；x为标准品浓度（mg/mL），y为吸光值。

#### 2、α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。

$$\alpha\text{淀粉酶活性(mg/min/g鲜重)} = [(\Delta A + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.612 \times (\Delta A + 0.1778) \div W$$

##### (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。

$$\alpha\text{淀粉酶活性 (mg/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.1612 \times (\Delta A + 0.1778) \div C_{\text{pr}}$$

##### (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个酶活力单位。

$$\alpha\text{淀粉酶活性 (mg/min/mL)} = [(\Delta A + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T = 0.1612 \times (\Delta A + 0.1778)$$

#### 3、总淀粉酶活性计算

##### (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。

$$\text{总淀粉酶活性(mg/min/g鲜重)} = 5 \times [(A4 - A3 + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 8.06 \times (\Delta A + 0.1778) \div W$$

##### (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。

$$\begin{aligned}\text{总淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mg prot}) &= 5 \times [(A_4 - A_3 + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 0.806 \times (A_4 - A_3 + 0.1778) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned}\text{总淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mL}) &= 5 \times [(A_4 - A_3 + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 0.806 \times (A_4 - A_3 + 0.1778)\end{aligned}$$

#### 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。

$$\beta\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{g鲜重}) = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} = [8.06 \times (A_4 - A_3 + 0.1778) - 1.612 \times (A_2 - A_1 + 0.1778)] \div W$$

(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。

$$\beta\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mg prot}) = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} = [0.806 \times (A_4 - A_3 + 0.1778) - 0.1612 \times (A_2 - A_1 + 0.1778)] \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\beta\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mL}) = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} = 0.806 \times (A_4 - A_3 + 0.1778) - 0.1612 \times (A_2 - A_1 + 0.1778)$$

5: 总淀粉酶稀释倍数; V反总: 反应体系总体积, 0.15mL; V样: 加入反应体系中样本体积, 0.075 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。