

β-淀粉酶 (β-amylase, β-AL) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：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。

需自备的仪器和用品：

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℃加热溶解后再用；

试剂二：15mL×1 瓶，4℃保存，若出现沉淀析出，需 70℃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℃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℃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℃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℃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 200 μL 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。

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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(mg/min/g 鲜重)} = [(A2-A1+0.1778) \div 3.7215 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 1.075 \times (A2-A1+0.1778) \div W$$

(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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(mg/min/mg prot)} = [(A2-A1+0.1778) \div 3.7215 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T \\ = 0.1075 \times (A2-A1+0.1778) \div Cpr$$

(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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(mg/min/mL)} = [(A2-A1+0.1778) \div 3.7215 \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \div T = 0.1075 \times (A2-A1+0.1778)$$

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。

$$\text{总淀粉酶活性(mg/min/g 鲜重)} = 5 \times [(A4-A3+0.1778) \div 3.7215 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 5.375 \times (A4-A3 \\ + 0.1778) \div W$$

(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。

$$\text{总淀粉酶活性(mg/min/mg prot)} = 5 \times [(A4-A3+0.1778) \div 3.7215 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T \\ = 0.5375 \times (A4-A3+0.1778) \div Cpr$$

(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。

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

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。

$$\beta\text{-淀粉酶活性 (mg/min/mg prot)} = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} = [0.5375 \times (A4-A3+0.1778) - 0.1075 \times (A2-A1+ \\ 0.1778)] \div Cpr$$

(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。

β -淀粉酶活性 (mg/min/mL) = 淀粉酶总活性 - α -淀粉酶活性 = $0.5375 \times (A4 - A3 + 0.1778) - 0.1075 \times (A2 - A1 + 0.1778)$

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。

α -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 个酶活性单位。

α -淀粉酶活性 (mg/min/mg prot) = $[(\Delta A + 0.1778) \div 2.481 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 0.1612 \times (\Delta A + 0.1778) \div Cpr$

(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) = $[(\Delta A + 0.1778) \div 2.481 \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \div T = 0.1612 \times (\Delta A + 0.1778)$

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。

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。

总淀粉酶活性(mg/min/mg prot) = $5 \times [(A4 - A3 + 0.1778) \div 2.481 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 0.806 \times (A4 - A3 + 0.1778) \div Cpr$

(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。

总淀粉酶活性(mg/min/mL) = $5 \times [(A4 - A3 + 0.1778) \div 2.481 \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \div T = 0.806 \times (A4 - A3 + 0.1778)$

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。

β -淀粉酶活性(mg/min/g 鲜重) = 淀粉酶总活性 - α -淀粉酶活性 = $[8.06 \times (A4 - A3 + 0.1778) - 1.612 \times (A2 - A1 + 0.1778)] \div W$

(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。

β -淀粉酶活性 (mg/min/mg prot) = 淀粉酶总活性 - α -淀粉酶活性 = $[0.806 \times (A4 - A3 + 0.1778) - 0.1612 \times (A2 - A1 + 0.1778)] \div Cpr$

(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。

β -淀粉酶活性 (mg/min/mL) = 淀粉酶总活性 - α -淀粉酶活性 = $0.806 \times (A4 - A3 + 0.1778) - 0.1612 \times (A2 - A1 + 0.1778)$

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。