

β-淀粉酶 (β-amylase, β-AL) 试剂盒说明书

(货号: BP10273W 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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 (α+β) 相比较, 求出β-淀粉酶的活性。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 1 瓶	4°C 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 用试剂一于80°C水浴溶解, 并定容至10mL; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C 避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C 保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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 (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°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 (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(10^4 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、检测步骤:

① 酶标仪预热30min以上,调节波长到540nm。

② 试剂二40℃预热10min,在EP管中依次加入:

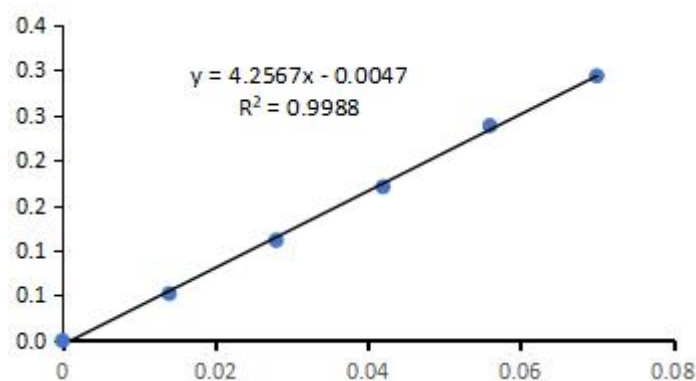
试剂组分 (μL)	总淀粉酶活力测定		α-淀粉酶活力测定	
	测定管	对照管	测定管	对照管
酶液 I			70	70
70℃水浴 15min 钝化, 冷却				
酶液 II	70	70		
蒸馏水		70		70
试剂二	70		70	
40℃恒温水浴中准确保温 5min				
试剂三	140	140	140	140
混匀, 95 度水浴 5min, 流水冷却, 取 200μL 至 96 孔板中, 540nm 处读取吸光值 A, 从左到右分别记为 A1、A2、A3 和 A4。 $\Delta A_{\text{总}} = (A1-A2)$; $\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} = (A3-A4)$ 。【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: $y = 4.2567x - 0.0047$; x为标准品质量(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。

$$\begin{aligned} \text{总淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= 5 \times [(\Delta A_{\text{总}} + 0.0047) \div 4.2567 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 3356.1 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0047) \div W \times D \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{总淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= 5 \times [(\Delta A_{\text{总}} + 0.0047) \div 4.2567 \times 10^3] \div (V1 \div V \times Cpr) \div T \times D \\ &= 3356.1 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0047) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

(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 μ g 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{总淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= 5 \times [(\Delta A_{\text{总}} + 0.0047) \div 4.2567 \times 10^3] \div (V1 \div V \times 500) \div T \times D \\ &= 3356.1 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0047) \div 500 \times D\end{aligned}$$

(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 μ g 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{总淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= 5 \times [(\Delta A_{\text{总}} + 0.0047) \div 4.2567 \times 10^3] \div V1 \div T \times D \\ &= 3356.1 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0047) \times D\end{aligned}$$

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 μ g 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0047) \div 4.2567 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 671.2 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0047) \div W \times D\end{aligned}$$

(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 μ g 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0047) \div 4.2567 \times 10^3] \div (V1 \div V \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 671.2 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0047) \div \text{Cpr} \times D\end{aligned}$$

(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 1 μ g 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0047) \div 4.2567 \times 10^3] \div (V1 \div V \times 500) \div T \times D \\ &= 671.2 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0047) \div 500 \times D\end{aligned}$$

(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 μ g 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0047) \div 4.2567 \times 10^3] \div V1 \div T \times D \\ &= 671.2 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0047) \times D\end{aligned}$$

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 μ g 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\beta\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} \\ &= [3356.1 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0047) - 671.2 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0047)] \div W \times D\end{aligned}$$

(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 μ g 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\beta\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} \\ &= [3356.1 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0047) - 671.2 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0047)] \div \text{Cpr} \times D\end{aligned}$$

(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 1 μ g 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\beta\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} \\ &= [3356.1 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0047) - 671.2 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0047)] \div 500 \times D\end{aligned}$$

(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 μ g 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\beta\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} \\ &= [3356.1 \times (\Delta A_{\text{总}} + 0.0047) - 671.2 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0047)] \times D\end{aligned}$$

5---总淀粉酶稀释倍数； V1---加入反应体系中样本体积，70 μ 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 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且 -20℃ 保存），标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	70	
蒸馏水	70	140
试剂三	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, $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		