

β -淀粉酶 (β -amylase, β -AL) 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号: BP10273W

注意: 请在试剂盒保质期内使用, 具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用, 不能用于临床诊断。

检测范围: 0.01-1mg/mL

灵敏度: 0.01mg/mL

有效期: 6个月

保存温度: 常温和 2-8°C

检测原理:

淀粉酶包括 α -淀粉酶 (EC3.2.1.1) 和 β -淀粉酶 (EC3.2.1.2)。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 540nm 有吸收峰; 通过测定 540nm 吸光度增加速率, 计算淀粉酶活性。本试剂盒采用 70℃ 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。

注意事项:

1. 不能使用过期产品, 不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用, 以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病, 所有的样品都应管理好, 按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂, 使用前请甩几下, 使粉剂落入底部。

试剂盒组分：

试剂名称	规格（48T/21S）	规格（96T/45S）	保存条件
试剂一	7.5mL×1 瓶	15mL×1 瓶	2-8℃
试剂二	15mL×1 瓶	30mL×1 瓶	常温，避光
标准品	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8℃

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、水浴锅、振荡器。

样本处理及要求：

1. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围，建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.01-1mg/mL，如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩，样本的稀释液为蒸馏水。

2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。

3. 组织样本：

(1) 称取 0.1g 样本，加 1mL 蒸馏水匀浆；将匀浆倒入离心管中，在室温下放置提取 15min，每隔 5min 振荡 1 次(10S)，使其充分提取；10000 g，25℃ 离心 10min，吸取上清液并且加蒸馏水定容至 10 mL，摇匀，即为淀粉酶原液。

(2) 淀粉酶稀释液：取部分淀粉酶原液，用蒸馏水稀释 5 倍，摇匀，即为淀粉酶稀释液，用于检测总淀粉酶活力。

4. 血清（浆）等液体样本：

(1) 作为淀粉酶原液可直接测定。若浑浊，则离心取上清检测。

(2) 取部分淀粉酶原液，用蒸馏水稀释 5 倍，摇匀，即为淀粉酶稀释液，用于检测总淀粉酶活力。

检测前准备工作：

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. 样本检测前，试剂一若出现沉淀析出，需 70℃ 加热溶解后再用；试剂二若有黄色晶体析出，需 90℃ 加热溶解后再用。
3. **标准品溶液的配制：**使用前取一支加 1mL 蒸馏水，配置成 10mg/mL 标准品母液，2-8℃ 保存 2 周。把标准品母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mg/mL。（注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从标准品母液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。）

编号	①	②	③	④	⑤	⑥
标准品浓度(μmol/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
10mg/mL 标准品(μL)	0	20	40	60	80	100
蒸馏水(μL)	1000	980	960	940	920	900

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照测定管加样体系操作，依据结

果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用蒸馏水稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

操作步骤：

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。
2. 试剂一、二：临用前 40℃ 预热 10min。
3. 样本测定（在 EP 管中依次加入）：

标曲操作表	试剂名称(μL)		标准管		
	不同浓度标准品		75		
	试剂一		75		
	试剂二		150		
混匀并离心 2s，95℃ 水浴 5min（推荐使用螺旋盖离心管，务必拧紧），流水冷却后，取 200 μL 到 96 孔板中，于 540nm 处测定 OD 值。					
样本操作表	试剂名称(μL)	α-淀粉酶活力测定		总淀粉酶活力测定	
		测定管	对照管	测定管	对照管
	淀粉酶原液	75	75		
	70℃ 水浴 15min，流水冷却				
	淀粉酶稀释液			75	75
	蒸馏水		75		75
	试剂一	75		75	
	40℃ 水浴 5min				
	试剂二	150	150	150	150

混匀并离心 2s, 95℃水浴 5min (推荐使用螺旋盖离心管, 务必拧紧), 流水冷却后, 取 200 μL 到 96 孔板中, 于 540nm 处测定 OD 值。

注: 每一个测定管需设置一个对照管。

实验结果结算:

1. 标准品拟合曲线: $y=ax+b$ 。

2. 血清、唾液样本的结果计算:

定义: 每毫升血清、唾液每分钟催化产生 1mg 还原糖为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活力(U/mL)}=(\Delta A_1-b)\div a\times V_{\text{酶促}}\div T\div V_{\text{反}}\times N=0.4\times(\Delta A_1-b)\div a\times N$$

$$\text{总淀粉酶活力(U/mL)}=5\times(\Delta A_2-b)\div a\times V_{\text{酶促}}\div T\div V_{\text{反}}\times N=2\times(\Delta A_2-b)\div a\times N$$

3. 组织样本的结果计算:

定义: 每克组织每分钟催化产生 1mg 还原糖为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活力(U/g 组织)}=(\Delta A_1-b)\div a\times V_{\text{酶促}}\div T\div W\times V_{\text{样}}\div V_{\text{反}}\times N=4\times(\Delta A_1-b)\div a\div W\times N$$

$$\text{总淀粉酶活力(U/g 组织)}=5\times(\Delta A_2-b)\div a\times V_{\text{酶促}}\div T\div W\times V_{\text{样}}\div V_{\text{反}}\times N=20\times(\Delta A_2-b)\div a\div W\times N$$

4. 蛋白质含量计算:

定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1mg 还原糖为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活力(U/mg prot)}=(\Delta A_1-b)\div a\times V_{\text{酶促}}\div T\div V_{\text{反}}\times N\div Cpr0.4\times(\Delta A_1-b)\div a\div Cpr\times N$$

$$\text{总淀粉酶活力 (U/mg prot)} = 5 \times (\Delta A_2 - b) \div a \times V_{\text{酶促}} \div T \div V_{\text{反}} \div \text{Cpr} \times N = 2 \times (\Delta A_2 - b) \div a \div \text{Cpr} \times N$$

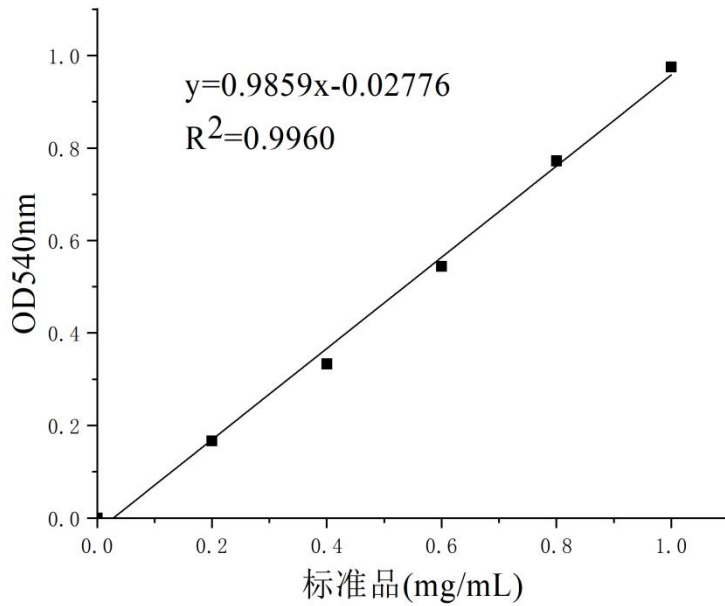
$$\beta\text{-淀粉酶活力} = \text{总淀粉酶活力} - \alpha\text{-淀粉酶活力}$$

注:

- | | |
|---|---|
| y: 标准孔 OD 值-空白孔 OD 值
(标准品浓度为 0 的 OD 值) | ΔA_1 : α -淀粉酶测定孔 OD 值-对照孔 OD 值 |
| a: 标曲的斜率 | ΔA_2 : 总淀粉酶测定孔 OD 值-对照孔 OD 值 |
| b: 标曲的截距 | $V_{\text{酶促}}$: 酶促反应体积, 0.15mL |
| x: 标准品的浓度 | $V_{\text{反}}$: 加入反应体系的样本体积, 0.075mL |
| Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL | T: 酶促反应时间, 5min |
| W: 样本质量, 0.1g | N: 样本稀释倍数 |
| 5: 总淀粉酶稀释倍数 | $V_{\text{样}}$: 组织样本制备的体积, 10mL |

参考曲线:

$y=0.9859x-0.02776, R^2=0.9960$, x 是标准品的浓度 (mg/mL), y 是 ΔA 。



注意：本图仅供参考，应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。