

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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[(A_2-A_1+0.1778)\div 3.7215\times V_{\text{反总}}]\div (W\times V_{\text{样}}\div V_{\text{样总}})\div T$$
$$=1.075\times (A_2-A_1+0.1778)\div W$$

(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 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mg prot})=[(A_2-A_1+0.1778)\div 3.7215\times V_{\text{反总}}]\div (V_{\text{样}}\times C_{\text{pr}})\div T$$
$$=0.1075\times (A_2-A_1+0.1778)\div C_{\text{pr}}$$

(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 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mL})=[(A_2-A_1+0.1778)\div 3.7215\times V_{\text{反总}}]\div V_{\text{样}}\div T=0.1075\times (A_2-A_1+0.1778)$$

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。

$$\text{总淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{g 鲜重})=5\times [(A_4-A_3+0.1778)\div 3.7215\times V_{\text{反总}}]\div (W\times V_{\text{样}}\div V_{\text{样总}})\div T$$
$$=5.375\times (A_4-A_3+0.1778)\div W$$

(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。

$$\text{总淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mg prot})=5\times [(A_4-A_3+0.1778)\div 3.7215\times V_{\text{反总}}]\div (V_{\text{样}}\times C_{\text{pr}})\div T$$
$$=0.5375\times (A_4-A_3+0.1778)\div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{总淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mL})=5\times [(A_4-A_3+0.1778)\div 3.7215\times V_{\text{反总}}]\div V_{\text{样}}\div T$$
$$=0.5375\times (A_4-A_3+0.1778)$$

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。

$$\beta\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{g 鲜重})=\text{淀粉酶总活性}-\alpha\text{-淀粉酶活性}=[5.375\times (A_4-A_3+0.1778)-1.075\times (A_2-A_1+0.1778)]\div W$$

(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。

$$\beta\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mg prot})=\text{淀粉酶总活性}-\alpha\text{-淀粉酶活性}=[0.5375\times (A_4-A_3+0.1778)-0.1075\times (A_2-A_1+0.1778)]\div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\beta\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mL})=\text{淀粉酶总活性}-\alpha\text{-淀粉酶活性}=0.5375\times (A_4-A_3+0.1778)-0.1075\times (A_2-A_1+0.1778)$$

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。

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) $= 5 \times [(\Delta A_4 - \Delta A_3 + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 8.06 \times (\Delta A_4 - \Delta A_3 + 0.1778) \div W$

(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) $= 5 \times [(\Delta A_4 - \Delta A_3 + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T = 0.806 \times (\Delta A_4 - \Delta A_3 + 0.1778) \div Cpr$

(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) $= 5 \times [(\Delta A_4 - \Delta A_3 + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T = 0.806 \times (\Delta A_4 - \Delta A_3 + 0.1778)$

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

(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。

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

(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。