

## 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°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200 $\mu$ L 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、 $\alpha$ 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。

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

$$= 1.075 \times (A2-A1 + 0.1778) \div W$$

(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。

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

$$= 0.1075 \times (A2-A1 + 0.1778) \div C\text{pr}$$

(3) 血清（浆）等液体样本中 $\alpha$ 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。

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

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。

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

(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。

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

$$= 0.5375 \times (A4-A3 + 0.1778) \div C\text{pr}$$

(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。

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。

β-淀粉酶活性(mg/min/g鲜重) = 淀粉酶总活性 - α-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。

β-淀粉酶活性 (mg/min/mg prot) = 淀粉酶总活性 - α-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。

β-淀粉酶活性 (mg/min/mL) = 淀粉酶总活性 - α-淀粉酶活性 =  $0.5375 \times (A4 - A3 + 0.1778) - 1.075 \times (A2 - A1 + 0.1778)$

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。

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个酶活力单位。

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

(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。

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。

$$\begin{aligned}\text{总淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mg prot}) &= 5 \times [(A4 - A3 + 0.1778) \div 2.481 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 0.806 \times (A4 - A3 + 0.1778) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

### (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。

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

## 4、 $\beta$ -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。

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

### (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。

$$\beta\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mg prot}) = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} = [0.806 \times (A4 - A3 + 0.1778) - 0.1612 \times (A2 - A1 + 0.1778)] \div C_{\text{pr}}$$

### (3) 血清（浆）等液体样本中 $\beta$ -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。

$$\beta\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mL}) = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} = 0.806 \times (A4 - A3 + 0.1778) - 0.1612 \times (A2 - A1 + 0.1778)$$

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。