

β -淀粉酶 (β -AL) 活性检测试剂盒说明书 (DNS 显色法)

微量法

货号: AC10380

规格: 100T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 |
|------|--------------|-------|
| 试剂一 | 液体 35 mL×1 瓶 | 常温保存 |
| 试剂二 | 粉剂×1 瓶 | 4°C保存 |
| 标准品 | 粉剂×1 支 | 4°C保存 |

溶液的配制:

- 1、试剂一: 若有黄色晶体析出, 需加热溶解后再用。
- 2、试剂二: 临用前加入 20 mL 蒸馏水, 置于常温水浴中并加热至煮沸, 期间不断搅拌粉剂至溶解。
- 3、标准品: 10 mg 无水葡萄糖, 临用前加入 1 mL 蒸馏水配制成 10 mg/mL 的标准溶液。

产品说明:

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) 从淀粉的非还原端切开 α -1,4糖苷键, 生成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、糊精等还原糖。

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。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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、96孔板/微量玻璃比色皿、研钵/匀浆器和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

称取约 0.1g 样本, 加入 0.8mL 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; 6000g, 常温离心 10min, 取上清液加蒸馏水定容至 10mL, 摇匀, 即淀粉酶原液。

吸取上述淀粉酶原液 1mL, 加入 4mL 双蒸水, 摇匀, 即为淀粉酶稀释液, 用于 (α + β) 淀粉酶总活力的测定。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上, 调节波长到540nm, 蒸馏水调零。
2. 将10mg/mL葡萄糖标准液用蒸馏水稀释为0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0.0078 mg/mL的标准溶液。

3. 取2支EP管分别加入75 μ L淀粉酶原液和淀粉酶稀释液，沸水浴5min，分别作为 α -淀粉酶对照管和 β -淀粉酶对照管使用。

4. 测定操作表：

| 试剂名称 (μ L) | α -淀粉酶活力测定 | | 总淀粉酶活力测定 | | 标准曲线的测定 | |
|--------------------|-------------------|-----|----------|-----|---------|-----|
| | 对照管 | 测定管 | 对照管 | 测定管 | 标准管 | 空白管 |
| 淀粉酶原液 | 75 (煮沸) | 75 | | | | |
| 蒸馏水 | | | | | | 75 |
| 标准溶液 | | | | | 75 | |
| 70°C水浴15min左右，冷却 | | | | | | |
| 淀粉酶稀释液 | | | 75 (煮沸) | 75 | | |
| 试剂二 | | 75 | | 75 | | |
| 于40°C恒温水浴中准确保温5min | | | | | | |
| 试剂一 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 |
| 试剂二 | 75 | | 75 | | 75 | 75 |

混匀，沸水浴 10min，取 200 μ L 至 96 孔板或微量玻璃比色皿中，在 540nm 下测定吸光度，从左到右分别记为 A1、A2、A3、A4、A5 和 A6，计算 $\Delta A_{\alpha}=A2-A1$ ， $\Delta A_{总}=A4-A3$ ， $\Delta A_{标准}=A5-A6$ 。

三、酶活性计算

1. **标准曲线的绘制：**以 ΔA 标准为y轴，以标准溶液浓度为x轴，绘制标准曲线，得到方程 $y=kx+b$ 。将 ΔA_{α} 测定带入方程得到 x_1 (mg/mL)， $\Delta A_{总}$ 代入方程得到 x_2 (mg/mL)。

2. **α -淀粉酶活性的计算：**

(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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(U/g 质量)}=x_1 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T=2 \times x_1 \div W$$

(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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(U/mg prot)}=x_1 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T=0.2 \times x_1 \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{总淀粉酶活性 (U/g 质量)}=5 \times x_2 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T=10 \times x_2 \div W$$

(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。

$$\text{总淀粉酶活性(U/mg prot)}=5 \times x_2 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T=x_2 \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\beta\text{-淀粉酶活性 (U/g 质量)}=\text{淀粉酶总活性}-\alpha\text{-淀粉酶活性}=(10 \times x_2 \div W) - (2 \times x_1 \div W) = (10 \times x_2 - 2 \times x_1) \div W$$

(2) 按照蛋白质含量计算

单位定义：每mg组织蛋白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 (U/mg prot) = 淀粉酶总活性 - α -淀粉酶活性 = $(x_2 \div Cpr) - (0.2 \times x_1 \div Cpr)$

5: 总淀粉酶稀释倍数; V样: 加入反应体系中样本体积, 0.075mL; V样总: 提取液总体积, 10mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 5min。

注意事项:

测定的吸光值大于1.5时, 可以对样本进行适当稀释后测定。若吸光值过小, 可以浓缩淀粉酶稀释液或者淀粉酶原液。

参考文献:

[1] Dzedzoave N T, Graffham A J, Westby A, et al. Influence of variety and growth environment on β -amylase activity of flour from sweet potato (*Ipomea batatas*)[J]. Food control, 2010, 21(2): 162-165.