β-淀粉酶检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1156BKM

保存：4℃保存 12 个月

规格：48T/12S 96T/24S

检测范围：0.0156-1mg/mL（标准品的检测范围，需要根据样本情况折算为活性的检测范围）

灵敏度：0.0078mg/mL（标准品的灵敏度，需要根据样本情况折算为活性的灵敏度）

适用样本：血清（浆）、唾液、动植物组织

产品简介

淀粉酶负责水解淀粉，主要包括α-淀粉酶（α-AL）和β-淀粉酶（β-AL，EC 3.2.1.2）。β-淀粉酶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。本试剂盒提供了一种简单的比色法来检测生物样本中β-淀粉酶活性。其原理是淀粉酶催化淀粉水解生成还原糖，还原糖还原 3,5-二硝基水杨酸生成棕红色物质，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。α-淀粉酶耐热，但是β-淀粉酶在 70℃下 15 min 可钝化。因此粗酶液经过 70℃钝化 15 min，就只有α-淀粉酶能够催化淀粉水解。用不钝化的粗酶液测出总淀粉酶活性，减去α-淀粉酶就可得到β-淀粉酶活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
DNS 试剂	35mL	70mL	常温避光保存
底物	1	1	4℃
标准品	1	1	4℃

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 540nm 处的吸光度）
水浴锅、离心机
96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
去离子水
匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。
DNS 试剂：常温保存，若有黄色晶体析出，需 90℃加热溶解后再用。
底物：临用前 96T 加入 35mL 去离子水，48T 加入 17.5mL 去离子水，上下颠倒摇晃几次，加热至溶解。溶解后的底物 4℃保存，若有沉淀析出，可 70℃加热溶解后使用。
标准品：含 10 mg 无水葡萄糖，临用前加入 1mL 去离子水溶解得 10 mg/mL 标准品。溶解后的标准品可 4℃保存 1 个月或-20℃长期保存。
标准曲线设置：按下表所示，用去离子水将 10mg/mL 标准品稀释为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0156 mg/mL 的标准溶液。

	标准品体积（μL）	去离子水体积（μL）	标准品浓度（mg/mL）
标准品 1	40μL 10mg/mL	360	1

标准品 2	200μL of 标准品 1 (1mg/mL)	200	0.5
标准品 3	200μL of 标准品 2 (0.5mg/mL)	200	0.25
标准品 4	200μL of 标准品 3 (0.25mg/mL)	200	0.125
标准品 5	200μL of 标准品 4 (0.125mg/mL)	200	0.0625
标准品 6	200μL of 标准品 5 (0.0625mg/mL)	200	0.0313
标准品 7	200μL of 标准品 6 (0.0313mg/mL)	200	0.0156

注意：每次实验，请使用新配制的标准品。

样本制备

1. 动物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 去离子水匀浆，将匀浆倒入离心管中，在室温下放置 15min，每隔 5min 振荡 1 次，使其充分提取。6,000g，室温离心 10min，吸取上清液并且加去离子水定容至 10mL，摇匀，即为淀粉酶原液。吸取上述淀粉酶原液 1mL，加入 4mL 去离子水，摇匀，即为淀粉酶稀释液，用于(α ＋ β)淀粉酶总活力的测定。
2. 植物组织，称取约 0.1g 样本，加入 1mL 去离子水捣碎，超声波破碎 5min（功率 20%，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），在室温下放置 15min，每隔 5min 振荡 1 次，使其充分提取。6,000g，室温离心 10min，吸取上清液并且加去离子水定容至 10mL，摇匀，即为淀粉酶原液。吸取上述淀粉酶原液 1mL，加入 4mL 去离子水，摇匀，即为淀粉酶稀释液，用于(α ＋ β)淀粉酶总活力的测定。
3. 血清（浆）和唾液等液体样本：直接测定，建议预实验确定合适的稀释倍数，适当稀释的液体样本即为淀粉酶原液。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。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 6 个月。对于脂肪含量较高的动物组织，离心后移除上层脂肪，再取上清液。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 540nm，可见光分光光度计去离子水调零；水浴锅预热到 70℃。
2. 每个样本取 2 支 EP 管分别加入 75μL 淀粉酶原液和淀粉酶稀释液，沸水浴 5min，分别作为α-淀粉酶对照管和总淀粉酶对照管使用。
3. 样本测定（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

	标准曲线的测定		α-淀粉酶活力测定		总淀粉酶活力测定	
	标准管（μL）	空白管（μL）	测定管（μL）	对照管（μL）	测定管（μL）	对照管（μL）
不同浓度标准品	75	0	0	0	0	0
去离子水	0	75	0	0	0	0
淀粉酶原液	0	0	75	75（煮沸原液）	0	0
70℃水浴 15min，冷却						
淀粉酶稀释液	0	0	0	0	75	75（煮沸稀释液）
底物	0	0	75	0	75	0
去离子水	75	75	0	0	0	0
40℃恒温水浴中保温 5min						
DNS 试剂	150	150	150	150	150	150

底物	0	0	0	75	0	75

4. 混匀，沸水浴 5min，冷却，取 200μL 至 96 孔板或微量玻璃比色皿中，测定 540nm 处的吸光值，计算 $\Delta A_{α}=A_{测定α}-A_{对照α}$； $\Delta A_{总}=A_{测定总}-A_{对照总}$； $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$。

注意：每个样本需分别设置α-淀粉酶活力测定对照和总淀粉酶活力测定对照，空白管只需做 1 管。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 $A_{测定}$大于 2，则说明样本酶活力太高，必须用去离子水稀释成适当浓度（计算公式中乘以相应稀释倍数）。若样本 $\Delta A_{测定}$小于 0.005 可以重新提取样本减少去离子水定容的体积。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线。将 $\Delta A_{α}$带入方程得到 y_1值（mg/mL），$\Delta A_{总}$带入方程得到 y_2值（mg/mL）。

2. α-淀粉酶活性计算

（1）按样本质量计算

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。

$α-淀粉酶活性(U/g\ 质量)=y_1\times V_{反总}\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\div T\times n=4\times y_1\div W\times n$

（2）按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

$α-淀粉酶活性（U/mg\ prot）=y_1\times V_{反总}\div（Cpr\times V_{样}）\div T\times n=0.4\times y_1\div Cpr\times n$

（3）按液体样本体积计算

单位的定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟产生 1 mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

$α-淀粉酶活性(U/mL)=y_1\times V_{反总}\div V_{样}\div T\times n=0.4\times y_1\times n$

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。

$总淀粉酶活性\ (U/g\ 质量)=5\times y_2\times V_{反总}\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\div T\times n=20\times y_2\div W\times n$

（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。

$总淀粉酶活性(U/mg\ prot)=5\times y_2\times V_{反总}\div(V_{样}\times Cpr)\div T\times n=2\times y_2\div Cpr\times n$

（3）按液体样本体积计算

单位的定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

$总淀粉酶活性(U/L)=5\times y_2\times V_{反总}\div V_{样}\div T\times n=2\times y_2\times n$

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。

$β-淀粉酶活性（U/g\ 质量）=淀粉酶总活性-α-淀粉酶活性=(20\times y_2\div W\times n)-(4\times y_1\div W\times n)$

$=(20\times y_2-4\times y_1)\div W\times n$

（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。

$β-淀粉酶活性（U/mg\ prot）=淀粉酶总活性-α-淀粉酶活性=(2\times y_2\div Cpr\times n)-(0.4\times y_1\div Cpr\times n)$

$=(2\times y_2-0.4\times y_1)\div Cpr\times n$

（3）按液体样本体积计算

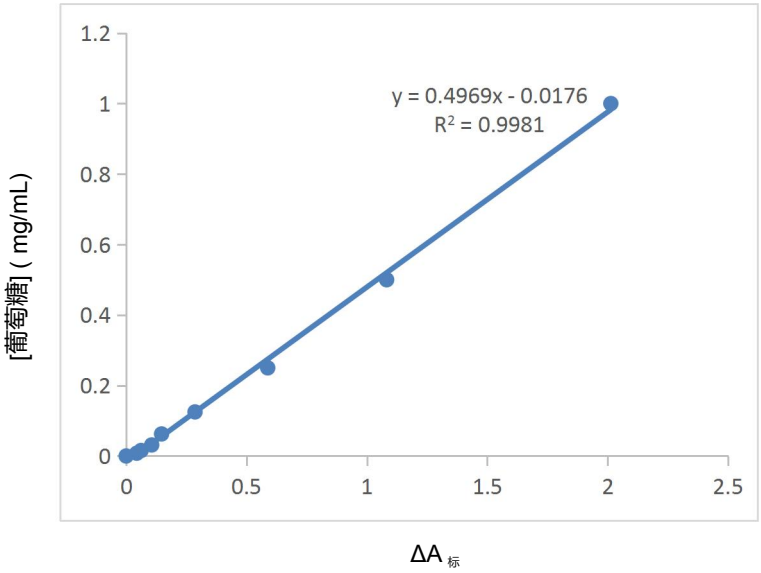
单位的定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

$β-淀粉酶活性(U/L)=淀粉酶总活性-α-淀粉酶活性=(2\times y_2\times n)-(0.4\times y_1\times n)=(2\times y_2-0.4\times y_1)\times n$

$V_{反总}$：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；W：样本质量，g；$V_{样总}$：样本总体积，10mL；T：反应时间，5min； n：样本稀释倍数；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；5：总淀粉酶稀释倍数。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1155BKM α-淀粉酶检测试剂盒（微量法）
PMK1955BKM α-淀粉酶抑制剂筛选/抑制剂活性试剂盒（微量法）
PMK1164BKM 葡萄糖检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：