



β-淀粉酶 (β-AL) 活性检测试剂盒 (碘-淀粉比色法) 说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC4585

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 15mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 瓶	2-8℃保存

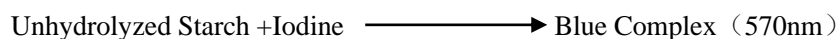
溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加入 15mL 试剂三，置于常温水中并加热至煮沸，期间不断搅拌粉剂至溶解，用不完的试剂 2-8℃保存 8 周；
- 2、标准品：10 mg 淀粉标准品。临用前加 10 mL 试剂三，置沸水浴中振荡溶解，配成 1 mg/mL 淀粉标准液。2-8℃保存四周。

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。

碘可以与未被淀粉酶水解的淀粉结合，生成在 570nm 下有特征吸收峰的复合物，其深浅可计算出淀粉酶的活力单位。α-AL 耐酸，β-AL 不耐热。根据上述特性，钝化其中之一，就可测得另一种活性。



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、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、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）

1、组织：称取约 0.1g 样本，加 1mL 蒸馏水匀浆；匀浆后在室温下放置提取 15min，每隔 5min 振荡 1 次，使其充分提取；6000g，常温离心 10min，吸取上清液即为淀粉酶原液。

2、液体：直接检测。（若有浑浊则离心后测定）

二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至570nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、将淀粉标准液用蒸馏水稀释为0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625mg/mL的标准溶液。

序号	稀释前浓度 (mg/mL)	标准液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 (mg/mL)
1	1	200	300	0.4
2	0.4	200	200	0.2
3	0.2	200	200	0.1
4	0.1	200	200	0.05
5	0.05	200	200	0.025
6	0.025	200	200	0.0125
7	0.0125	200	200	0.00625

实验中每个标准管需100μL标准溶液。

3、按操作表依次加入各试剂：

试剂名称 (μL)	α-淀粉酶活力测定		总淀粉酶活力测定		空白管 5	标准曲线的测定	
	测定管 1	对照管 2	测定管 3	对照管 4		标准管 6	标准空白管 7
样本	100	100	-	-	-	-	-
蒸馏水	-	-	-	-	100	-	100
标准溶液	-	-	-	-	-	100	-
70°C水浴 15min 左右，冷却					-		
样本	-	-	100	100	-	-	-
试剂一	100	-	100	-	100	-	-
蒸馏水	-	100	-	100	-	100	100
于 40°C恒温水浴中准确保温 5min							
试剂二	50	50	50	50	50	50	50

混匀后吸取 200μL 于微量玻璃比色皿或者 96 孔板中测定 570nm 下的吸光度，从左到右分别记为 A1、A2、A3、A4、A5 和 A6，计算 $\Delta A_{\alpha} = A5 - (A1 - A2)$ ， $\Delta A_{\text{总}} = A5 - (A3 - A4)$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A6 - A7$ 。空白管、标准曲线只需做 1-2 次。

三、β-淀粉酶活性计算

1、标准曲线的绘制

根据标准管的浓度 (x, mg/mL) 和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ (y, $\Delta A_{\text{标准}}$)，建立标准曲线。将 ΔA_{α} 测定带入方程得到 x_1 (mg/mL)， $\Delta A_{\text{总}}$ 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组织每分钟消耗1mg 淀粉定义为1个酶活力单位。

α -淀粉酶活性(U/g 质量) = $x_1 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.2 \times x_1 \div W$

(2) 按照蛋白质浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟消耗1mg淀粉定义为1个酶活性单位。

α -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) 按液体体积计算：

单位定义：每mL液体每分钟消耗1mg淀粉定义为1个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(U/mL)} = x_1 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \div T = 0.2 \times x_1$$

V样：加入反应体系中样本体积，0.1mL；V样总：样本总体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，5min。

3、总淀粉酶活性的计算

(1) 按照样本质量计算

单位定义：每g组织每分钟消耗1mg 淀粉定义为1个酶活力单位。

$$\text{总淀粉酶活性(U/g 质量)} = x_2 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.2 \times x_2 \div W$$

(2) 按照蛋白质浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟消耗1mg淀粉定义为1个酶活性单位。

$$\text{总淀粉酶活性(U/mg prot)} = x_2 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 0.2 \times x_2 \div \text{Cpr}$$

(3) 按液体体积计算：

单位定义：每mL液体每分钟消耗1mg淀粉定义为1个酶活性单位。

$$\text{总淀粉酶活性(U/mL)} = x_2 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.2 \times x_2$$

V样：加入反应体系中样本体积，0.1mL；V样总：样本总体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，5min。

4、 β -淀粉酶活性的计算

(1) 按照样本质量计算

单位定义：每g组织每分钟消耗1mg 淀粉定义为1个酶活力单位。

$$\beta\text{-淀粉酶活性(U/g 质量)} = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} = 0.2 \times x_2 \div W - 0.2 \times x_1 \div W$$

(2) 按照蛋白质浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟消耗1mg淀粉定义为1个酶活性单位。

$$\beta\text{-淀粉酶活性(U/mg prot)} = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} = 0.2 \times x_2 \div \text{Cpr} - 0.2 \times x_1 \div \text{Cpr}$$

(3) 按液体体积计算：

单位定义：每mL液体每分钟消耗1mg淀粉定义为1个酶活性单位。

$$\beta\text{-淀粉酶活性(U/mL)} = \text{淀粉酶总活性} - \alpha\text{-淀粉酶活性} = 0.2 \times x_2 - 0.2 \times x_1$$

注意事项：

吸光值大于 1.5 或者 ΔA 大于 0.8 时，可以对样本进行适当稀释后测定。

实验实例：

1. 取约 0.1g 藜叶片进行样本处理，取上清液后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\alpha} = A_5 - (A_1 - A_2) = 1.065 - (0.849 - 0.220) = 0.436$ ， $\Delta A_{\text{总}} = A_5 - (A_3 - A_4) = 1.065 - (0.677 - 0.197) = 0.585$ ，带入标准曲线 $y = 2.628x - 0.0051$ ，计算 $x_1 = 0.1678$ ， $x_2 = 0.2245$ ，按样本质量计算酶活得：
 $\beta\text{-淀粉酶活性(U/g 质量)} = 0.2 \times x_2 \div W - 0.2 \times x_1 \div W = 0.2 \times 0.2245 \div 0.1 - 0.2 \times 0.1678 \div 0.1 = 0.1134 \text{ U/g 质量}$ 。

相关系列产品：

BC4570/BC4575 α -淀粉酶 (α -AL) 活性检测试剂盒 (碘-淀粉比色法)

