

植物β-淀粉酶（β-AMS）检测试剂盒说明书

一、测定意义：

β-淀粉酶是一种外切型的淀粉酶，它从淀粉或低聚糖的非还原性末端，以麦芽糖为单位，顺次水解α-1,4糖苷键，并使切下的麦芽糖还原性末端葡萄糖残基构型转变为β-型。β-淀粉酶广泛存在于大麦、小麦、玉米、大豆、甘薯等植物和一些微生物中。

二、测定原理：

淀粉酶水解淀粉产生还原糖，还原糖能使3,5-二硝基水杨酸还原，生成棕红色产物，其吸光度值变化来计算淀粉酶的活性。α-淀粉酶不耐酸，β-淀粉酶不耐热。根据他们的这种特性，测定时钝化其中之一，就可以测定出另一个的活力。

三、试剂组成：

试剂编号	试剂名称	试剂装量	保存条件
R1	试剂一	液体 50 mL×1 瓶	4℃保存
R2	试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存
R3	标准品（10mg）	粉剂×1 支	4℃保存
	标准品（10mg/mL）配制：临用前加 1mL 蒸馏水充分溶解。		

四、操作步骤：

样本前处理

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，常温离心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。

测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 540nm，用蒸馏水调零。
- 2、试剂回复至常温；

3、操作表:

试剂名称	α-淀粉酶		总淀粉酶		标准品	
	对照管	测定管	对照管	测定管	空白管	标准管
淀粉酶原液 (μL)	250	250				
蒸馏水 (μL)					250	
标准品 (μL)						250
70℃水浴15min 左右, 冷却						
淀粉酶稀释液 (μL)			250	250		
蒸馏水 (μL)	250		250		250	250
试剂二 (μL)		250		250		
在40℃恒温水浴中准确保温5min						
试剂一 (μL)	500	500	500	500	500	500
混匀, 95水浴5min,冷却后, 波长540nm, 1mL比色皿, 测定各管吸光度值。						

五、植物样本中β-淀粉酶活性计算:

1、标准条件下测定回归曲线:

$y=3.7215x-0.1778$; 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。

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

(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。

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

3、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。

$$\text{总淀粉酶活力 (U/g组织)} = 5 \times [(A_4 - A_3 + 0.1778) \div 3.7215 \times V_{\text{反应}}] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 5.375 \times (A_4 - A_3 + 0.1778) \div W$$

(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。

$$\text{总淀粉酶活力 (U/mgprot)} = 5 \times [(A_4 - A_3 + 0.1778) \div 3.7215 \times V_{\text{反应}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.5375 \times (A_4 - A_3 + 0.1778) \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\beta\text{-淀粉酶活力 (U/g组织)} = \text{总淀粉酶活力} - \alpha\text{-淀粉酶活力} = [5.375 \times (A_4 - A_3 + 0.1778) - 1.075 \times (A_2 - A_1 + 0.1778)] \div W$$

(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。

$$\beta\text{-淀粉酶活力 (U/g组织)} = \text{总淀粉酶活力} - \alpha\text{-淀粉酶活力} = [0.5375 \times (A_4 - A_3 + 0.1778) - 0.1075 \times (A_2 - A_1 + 0.1778)] \div C_{\text{pr}}$$

5: 总淀粉酶稀释倍数;

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积, 0.5mL;

$V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.25 mL;

$V_{\text{样总}}$: 提取液总体积, 10 mL;

C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL;

W : 样本质量, g;

T : 反应时间, 5min。

附录 I β -淀粉酶标准曲线制备

- 1、取适量麦芽糖标准品 10mg/mL 用蒸馏水稀释 0.00625、0.0125、0.025、0.05、0.1、0.2mg/mL，按照操作表操作。

标准品浓度 (mg/mL)	0	0.00625	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2
标准品 (μ L)	250	250	250	250	250	250	250
70℃水浴15min 左右，冷却							
蒸馏水 (μ L)	250	250	250	250	250	250	250
在40℃恒温水浴中准确保温5min							
试剂一 (μ L)	500	500	500	500	500	500	500
混匀，95水浴5min,冷却后，波长540nm，1mL比色皿，测定各管吸光度值。							

2、测定结果

以吸光值为横坐标，标准品浓度为纵坐标，绘制标曲。得到方程 $y=kx+b$ 。把吸光度值带入标曲，计算出还原糖的含量 (mg/mL)