

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K005-M

产品规格: 96T(20 samples)

检测仪器: 酶标仪(535-540 nm)

Elabscience® β -淀粉酶比色法测试盒

β -Amylase Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测植物组织样本中的 β -淀粉酶活力。

检测原理

还原糖与 3, 5-二硝基水杨酸在加热条件下反应, 生成棕红色物质, 利用 β -淀粉酶不耐热的特性, 将其钝化, 测定总酶活与 α -淀粉酶的酶活, 间接测定 β -淀粉酶的活力。

本试剂盒检测组织样本时, 需要测定总蛋白浓度, 推荐使用考马斯亮蓝法(货号: E-BC-K168-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	底物 (Substrate)	10 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 12 个月
试剂二 (Reagent 2)	显色剂 (Chromogenic Agent)	20 mL×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 12 个月
试剂三 (Reagent 3)	10 mg/mL 标准品 (10 mg/mL Standard)	1.5 mL×1 支	2-8℃ 保存 12 个月
	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(535-540 nm，最佳检测波长 540 nm)，恒温水浴锅(95 ℃)

试剂准备

- ① 检测前，试剂盒中的试剂一、二、三平衡至室温。
- ② 样本检测前，试剂一、二40 ℃预热10 min，试剂二如果有固体析出，需70-80℃水浴加热溶解，流水冷却至40℃后待用。
- ③ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mg/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
10 mg/mL 标准品 (μL)	0	20	40	60	80	100	120	140
双蒸水(μL)	1000	980	960	940	920	900	880	860

样本准备

① 样本处理

组织样本：淀粉酶原液【用于检测 α -淀粉酶活力】：称取 0.1 g 组织样本，加入 0.9 mL 双蒸水，研磨匀浆(也可机械匀浆)，收集匀浆至离心管中，匀浆在室温下放置提取 15 min，每 5 min 振荡一次(10 s)，使其充分提取，提取完成后，室温条件下， $3000 \times g$ ，离心 10 min，取上清加双蒸水定容至 10 mL，混匀，得到淀粉酶原液。

淀粉酶稀释液【用于检测($\alpha+\beta$)淀粉酶活力】：取部分淀粉酶原液，用双蒸水稀释 5 倍即可。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.97-34.74 U/g组织，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
玉米	不稀释	青椒	不稀释
胡萝卜	不稀释	绿萝	不稀释

注：稀释液为双蒸水；此处的稀释是指在淀粉酶原液的基础上进行稀释。

实验关键点

- ① 试剂一中若有沉淀析出，需 70-80 °C 加热溶解后，冷却至 40°C 待用。
- ② 试剂二中若有黄色固体析出，需 70-80 °C 加热溶解后，冷却至 40°C 待用。
- ③ 显色完成后，若有沉淀，可室温条件下 $4000 \times g$ 离心 5 min，取上清测定。
- ④ 当绝对 OD 值大于 0.747 时，需要适当稀释。

操作步骤

标准曲线部分

- ① 取 16 个 1.5 mL 的 EP 管，并编号 A-H，每个编号两管，分别取 75 μL 不同浓度标准品，加入到对应的标准管中。
- ② 向①中各标准管加入 75 μL 试剂一。
- ③ 向②中各标准管加入 150 μL 试剂二。
- ④ 混匀 3 s，95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min，流水冷却后，取 250 μL 到酶标板中，酶标仪 540 nm 处，测定各孔 OD 值。

样本部分

α -淀粉酶活力测定

- ① 对照管、测定管：取 75 μL 淀粉酶原液加入到对照管、测定管中。
- ② 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min，流水冷却。
- ③ 对照管：向②中对照管加入 75 μL 双蒸水。
测定管：向②中测定管加入 75 μL 试剂一。
- ④ 40 $^{\circ}\text{C}$ 准确反应 5 min。
- ⑤ 向④中各管加入 150 μL 试剂二。
- ⑥ 混匀 3 s，95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min，流水冷却后，取 250 μL 到酶标板中，酶标仪 540 nm 处，测定各孔 OD 值。

$(\alpha+\beta)$ 淀粉酶活力测定

- ① 对照管、测定管：取 75 μL 淀粉酶稀释液加入到对照管、测定管中。
- ② 对照管：向①中对照管加入 75 μL 双蒸水。
测定管：向①中测定管加入 75 μL 试剂一。
- ③ 40 $^{\circ}\text{C}$ 准确反应 5 min。
- ④ 向③中各管加入 150 μL 试剂二。
- ⑤ 混匀 3 s，95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min，流水冷却后，取 250 μL 到酶标板中，酶标仪 540 nm 处，测定各孔 OD 值。

操作表

标曲操作表

	标准管
不同浓度标准品(μL)	75
试剂一(μL)	75
试剂二(μL)	150
混匀 3 s, 95 °C 水浴 5 min, 流水冷却后, 取 250 μL 到酶标板中, 酶标仪 540 nm 处, 测定各孔 OD 值。	

样本操作表

	α -淀粉酶活力测定		$(\alpha+\beta)$ 淀粉酶活力测定	
	对照管	测定管	对照管	测定管
淀粉酶原液(μL)	75	75	--	--
70 °C 水浴 15 min, 流水冷却				
淀粉酶稀释液(μL)	--	--	75	75
双蒸水(μL)	75	--	75	--
试剂一(μL)	--	75	--	75
40 °C 准确反应 5 min				
试剂二(μL)	150	150	150	150
混匀 3 s 后, 95 °C 水浴 5 min, 冷却后取 250 μL 到酶标板中, 酶标仪 540 nm 处, 测各孔 OD 值。				

本试剂盒检测组织样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用考马斯亮蓝法(货号: E-BC-K168-M)。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织样本的结果计算:

定义: 每克组织每分钟催化产生 1 mg 还原糖为 1 个酶活单位。

α -淀粉酶活力计算公式:

$$\alpha\text{-淀粉酶活力} \quad (\text{U/g 组织}) = (\Delta A - b) \div a \times V_3 \div t \div w \times \frac{V_1}{V_2} \times f$$

$(\alpha+\beta)$ 淀粉酶活力计算公式:

$$(\alpha+\beta)\text{淀粉酶活力} \quad (\text{U/g 组织}) = (\Delta A - b) \div a \times V_3 \div t \div w \times \frac{V_1}{V_2} \times f \times 5^*$$

或者定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 mg 还原糖为 1 个酶活单位

α -淀粉酶活力计算公式:

$$\alpha\text{-淀粉酶活力} \quad (\text{U/mgprot}) = (\Delta A - b) \div a \times V_3 \div t \div V_2 \times f \div C_{pr}$$

$(\alpha+\beta)$ 淀粉酶活力计算公式:

$$(\alpha+\beta)\text{淀粉酶活力} \quad (\text{U/mgprot}) = (\Delta A - b) \div a \times V_3 \div t \div V_2 \times f \div C_{pr} \times 5^*$$

β -淀粉酶活力 = $(\alpha+\beta)$ 淀粉酶活力 - α -淀粉酶活力

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: OD 值对应的浓度

a: 标准曲线斜率

b: 标准曲线截距

ΔA : 样本测定 OD 值-对照 OD 值

V_3 : 酶促反应体积(0.15 mL)

V_2 : 加入反应体系中的样本体积(0.075 mL)

V_1 : 组织样本制备淀粉酶原液的体积(10 mL)

t: 酶促反应时间(5 min)

f: 在淀粉酶原液基础上稀释的倍数

*: 制备淀粉酶稀释液时被稀释的倍数(5 倍)

w: 制备淀粉酶原液时所需的样本质量(0.1 g)

C_{pr} : 样本加入检测体系前的蛋白浓度(mgprot/mL)

附录1 关键数据

1. 技术参数

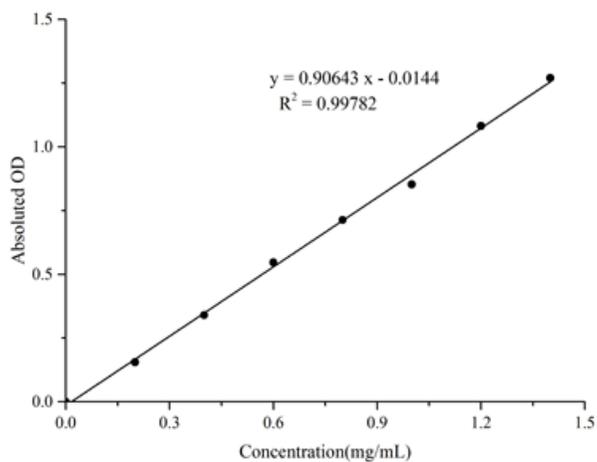
检测范围	0.97-34.74 U/g 组织	平均批间差	3.2 %
灵敏度	0.97 U/g 组织	平均批内差	2.3 %
平均回收率	96 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 标准品浓度测定数据:

标准品浓度 (mg/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
OD 值	0.156	0.308	0.497	0.700	0.886	1.013	1.238	1.440
	0.155	0.313	0.494	0.704	0.851	1.003	1.236	1.411
平均 OD 值	0.156	0.310	0.496	0.702	0.869	1.008	1.237	1.426
绝对 OD 值	0	0.154	0.340	0.546	0.713	0.852	1.081	1.270

② 绘制标曲(如下图):



附录2 实例分析

例如检测青椒(数据仅供参考):

取0.1 g青椒,按样本处理部分,得到淀粉酶原液,取淀粉酶原液100 μ L,用双蒸水稀释5倍,得到淀粉酶稀释液,之后按照说明书操作,结果如下:标准曲线: $y = 0.8729x - 0.0112$, α -淀粉酶活力计算:测定孔平均OD值为0.368,对照孔平均OD值为0.247,计算结果为:

$$\alpha\text{-淀粉酶活力(U/g组织)} = (0.368 - 0.247 + 0.0112) \div 0.8729 \times 0.15$$

$$\div 5 \div 0.1 \times 10 \div 0.075 = 6.06 \text{ U/g组织}$$

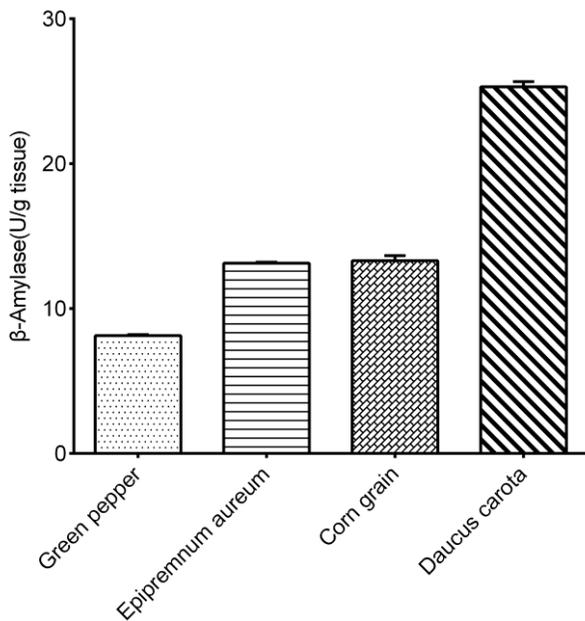
(α + β)淀粉酶活力计算:测定孔平均OD值为0.205,对照孔平均OD值为0.154,计算结果

$$\text{为: } (\alpha+\beta)\text{淀粉酶活力(U/g组织)} = (0.205 - 0.154 + 0.0112) \div 0.8729 \times 0.15$$

$$\div 5 \div 0.1 \times 10 \div 0.075 \times 5 = 14.25 \text{ U/g组织}$$

$$\beta\text{淀粉酶活力(U/g组织)} = (\alpha+\beta)\text{淀粉酶活力} - \alpha\text{-淀粉酶活力} = 14.25 - 6.06 = 8.19 \text{ U/g组织}$$

按照说明书操作，测定1%青椒匀浆(加样量75 μL)、1%绿萝匀浆(加样量75 μL)、1%玉米粒匀浆(加样量75 μL)和1%胡萝卜匀浆(加样量75 μL)中 β -淀粉酶活力含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
绝对 OD 值低	OD 值太高	增大稀释倍数
	样本值低	减小稀释倍数
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数, 重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本, 重新检测
样本测量结果 > 0.56 U/mL	样本浓度太高	选择合适稀释倍数, 重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用, 如将其用于临床诊断或任何其他用途, 我公司将不对因此产生的问题负责, 亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器, 严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责, 不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责, 使用前请充分考虑样本可能的使用量, 预留充足的样本。