

α -淀粉酶活性检测试剂盒(碘-淀粉比色法)

中文名称： α -淀粉酶活性检测试剂盒(碘-淀粉比色法)

英文名称： α -Amylase (α -AL) Activity Assay Kit(Iodine-starch colorimetry)

产品包装：盒装

产品规格：50T/24S

储存条件：-20°C

检测方法：可见分光光度法

有效期：6个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	粉剂×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 10mL×1 支	2-8°C保存
试剂三	液体 30mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 瓶	2-8°C保存

溶液的配制：

1、试剂一：临用前加入 12.5mL 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°C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°C保存四周。

产品说明：

淀粉酶负责水解淀粉,包括 α -淀粉酶和 β -淀粉酶。 α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)可随机地作用于淀粉中的 α -1,4-糖苷键,生成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、糊精等还原糖，同时使淀粉的粘度降

低，因此又称为液化酶。

α -淀粉酶催化淀粉分子中的 α -1,4糖苷键水解,产生葡萄糖、麦芽糖以及糊精等,碘可以与未被水解的淀粉结合,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耐热,但是 β -淀粉酶可在70°C钝化15min。因此粗酶液经过70°C钝化15min,就只有 α -AL能够催化淀粉水解。



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、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL玻璃比色皿,研钵/匀浆器、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理

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,室温离心10min,吸取上清液即为淀粉酶原液。

2、液体：直接检测。(若有浑浊则离心后进行测定)

二、测定步骤

1、分光光度计预热30min以上,调节波长至570nm,蒸馏水调零。

2、将淀粉标准液用蒸馏水稀释为0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.0015625mg/mL的标准溶液。

序号	稀释前浓度($\mu\text{mol/mL}$)	标准溶液体积(μL)	蒸馏水体积(μL)	稀释后浓度($\mu\text{mol/mL}$)
1	1	200	800	0.2

2	0.2	500	500	0.1
3	0.1	500	500	0.05
4	0.05	500	500	0.025
5	0.025	500	500	0.125
6	0.0125	500	500	0.00625
7	0.00625	500	500	0.003125
8	0.003125	500	500	0.0015625

实验中每个标准管需 250 μ L 标准溶液。

3、按操作表依次加入各试剂：

试剂(μ L)	测定管	对照管	空白管	标准管	标准空白管
α -淀粉酶原液	250	250	-	-	-
蒸馏水	-	-	250	-	250
标准溶液	-	-	-	250	-
70 $^{\circ}$ C水浴 15min 左右，冷却					
试剂一	250	-	250	-	-
蒸馏水	-	250	-	250	250
在 40 $^{\circ}$ C恒温水浴中准确保温 10min					
试剂二	125	125	125	125	125
蒸馏水	375	375	375	375	375

混匀后于 570nm 处读取测定管、对照管、空白管、标准管、标准空白管吸光度，分别记为 A 测定、A 对照、A 空白、A 标准和 A 标准空白，计算 ΔA 测定=A 空白- (A 测定-A 对照)， ΔA 标准=A 标准-A 标准空白。空白管 和标准曲线只需做 1-2 次。

三、 α -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 ΔA 标准 (y , ΔA 标准)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA 测定 (y , ΔA 测定) 带入公式计算样本浓度 (x,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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.1 \times x \div W$$

(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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.1 \times x \div C_{\text{pr}}$$

(3) 按照液体体积计算

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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性 (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.1 \times x$$

V 样：加入反应体系中样本体积,0.25mL; 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,10min。

注意事项：

吸光值大于 1.2 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，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，室温离心 10min，吸取上清液，之后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) = 0.915 - (0.703 - 0.176) = 0.388$ ，带入标准曲线 $y = 2.1736x + 0.0057$ ，计算 $x = 0.176$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\alpha\text{-淀粉酶活性 (U/g 质量)} = 0.1 \times x \div W = 0.176 \text{ U/g 质量。}$$