

## $\alpha$ -淀粉酶活性检测试剂盒(碘-淀粉比色法)

中文名称： $\alpha$ -淀粉酶活性检测试剂盒(碘-淀粉比色法)

英文名称： $\alpha$ -Amylase ( $\alpha$ -AL) Activity Assay Kit(Iodine-starch colorimetry)

产品包装：盒装

产品规格：50T/24S

储存条件：-20℃

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℃保存
试剂二	液体 10mL×1 支	2-8℃保存
试剂三	液体 30mL×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 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℃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,包括 $\alpha$ -淀粉酶和 $\beta$ -淀粉酶。 $\alpha$ -淀粉酶(EC 3.2.1.1)可随机地作用于淀粉中的 $\alpha$ -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。

$\alpha$ -淀粉酶催化淀粉分子中的 $\alpha$ -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。 $\alpha$ -AL 耐热, 但是 $\beta$ -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 $\alpha$ -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(可适当调整待测样本量)

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( $\mu\text{L}$ )	蒸馏水体积( $\mu\text{L}$ )	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 $\mu\text{L}$  标准溶液。

### 3、按操作表依次加入各试剂：

试剂( $\mu\text{L}$ )	测定管	对照管	空白管	标准管	标准空白管
$\alpha$ -淀粉酶原液	250	250	-	-	-
蒸馏水	-	-	250	-	250
标准溶液	-	-	-	250	-
70°C水浴 15min 左右，冷却					
试剂一	250	-	250	-	-
蒸馏水	-	250	-	250	250
在 40°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  $\Delta A$  测定=A 空白- (A 测定-A 对照)， $\Delta A$  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、 $\alpha$ -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 $\Delta A$  标准 (y , $\Delta A$  标准)，建立标准曲线。根据标

准曲线, 将 $\Delta A$ 测定 ( $y, \Delta A$ 测定) 带入公式计算样本浓度 ( $x, \text{mg/mL}$ )。

## 2、 $\alpha$ -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。

$\alpha$ -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。

$\alpha$ -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。

$\alpha$ -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  $\Delta A$  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  $\Delta A$  测定 = A 空白 - (A 测定 - A 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:

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