

α -淀粉酶 (α -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：BC4575

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°C保存
试剂二	液体 10mL×1 支	2-8°C保存
试剂三	液体 30 mL×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 6.25 mL 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：

酶标仪/可见分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、96孔板/微量玻璃比色皿、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，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，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/酶标仪预热30min以上，调节波长到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 (μL)	测定管	对照管	空白管	标准管	标准空白管
α-淀粉酶原液	100	100	-	-	-
蒸馏水	-	-	100	-	100
标准溶液	-	-	-	100	-
70°C水浴15min左右，冷却					
试剂一	100	-	100	-	-
蒸馏水	-	100	-	100	100
在40°C恒温水浴中准确保温10min					
试剂二	50	50	50	50	50

混匀后吸取 200μL 于微量玻璃比色皿或者 96 孔板中读取测定管、对照管、空白管、标准管、标准空白管 570nm 下的吸光度，分别记为 A 测定、A 对照、A 空白、A 标准和 A 标准空白，计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白}$ ($A_{测定} - A_{对照}$)， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{标准空白}$ 。标准曲线和标准空白管只需做 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 $\Delta A_{标准}$ (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, mg/mL)。

- 2、α-淀粉酶活性计算

- (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。

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

- (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。

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

- (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。

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

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，10min。

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，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，用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) = 1.065 - (0.849 - 0.220) = 0.436$ ，带入标准曲线 $y = 2.628x - 0.0051$ ，计算 $x = 0.168$ ，按样本质量计算酶活得：

α -淀粉酶活性 (U/g 质量) = $0.1 \times x \div W = 0.168 \text{ U/g 质量}$ 。

相关系列产品：

BC4580/BC4585 β -淀粉酶 (β -AL) 活性检测试剂盒 (碘-淀粉比色法)

