

α -淀粉酶检测试剂盒

可见分光光度法

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

货号：BC0610

规格：50T/24S

产品内容：

试剂一：液体40mL×1瓶，常温保存，若有黄色晶体析出，需加热溶解后再用；

试剂二：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加入20mL蒸馏水，置于常温水中并加热至煮沸，期间不断搅拌粉剂至溶解；

标准品：粉剂×1支，10mg无水葡萄糖。

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。

淀粉水解酶催化淀粉水解生成还原糖，还原糖还原3,5-二硝基水杨酸生成棕红色物质，在540 nm有吸收峰；通过测定540 nm吸光度增加速率，计算淀粉酶活性。 α -AL耐热，但是 β -淀粉酶可在70℃钝化15min。因此粗酶液经过70℃钝化15min，就只有 α -AL能够催化淀粉水解。

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、玻璃比色皿、研钵和蒸馏水。

操作步骤：

一、粗酶液提取：

称取约0.1g样本，加0.8mL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，常温离心10min，吸取上清液并加蒸馏水定容至10 mL，摇匀，即为淀粉酶原液。

二、测定步骤和加样表：

1、分光光度计预热30min以上，调节波长至540nm。

2、将葡萄糖用蒸馏水稀释为0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0.0078和0.0039 mg/mL的标准溶液。

3、按操作表依次加入各试剂：

试剂 (μ L)	对照管	测定管	标准管	空白管
α -淀粉酶原液	250	250	-	-
蒸馏水	-	-	-	250
标准溶液 (mg/mL)	-	-	250	-
70℃水浴15min左右，冷却				
试剂一	500	-	-	-

将以上对照管、测定管和试剂二置于40℃恒温水浴中保温10min左右				
试剂二	250	250	250	250
在40℃恒温水浴中准确保温5min				
试剂一	-	500	500	500

混匀，90℃水浴10min，蒸馏水调零，540nm处读取对照管、测定管、标准管、空白管吸光度，分别记为A对照、A测定、A标准和A空白，计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。

三、 α -淀粉酶活性计算：

1、标准曲线的绘制

以 $\Delta A_{标准}$ 为y轴，以标准溶液浓度为x轴，绘制标准曲线，得到方程 $y = kx + b$ 。将 $\Delta A_{测定}$ 带入方程得到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组织每分钟催化产生1mg还原糖定义为1个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2 \times x \div W$$

(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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{mg prot}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.2 \times x \div C_{\text{pr}}$$

V样：加入反应体系中样本体积，0.25 mL；V样总：提取液总体积，10 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，5min。

注意事项：

当测定的吸光值大于1时，可以对样本进行适当稀释后测定。