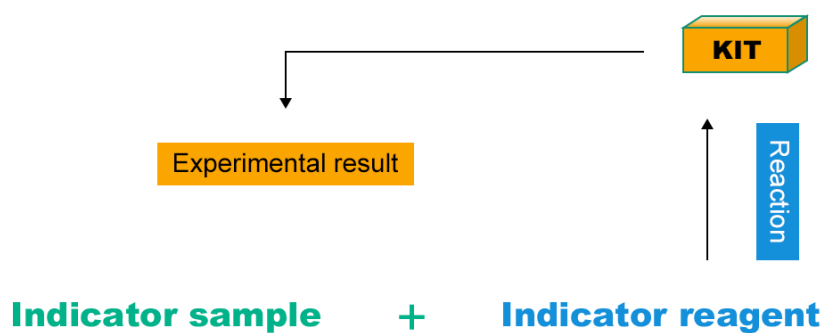


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0781

Size: 50T/24S

α -淀粉酶检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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 540nm 有吸收峰; 通过测定 540nm 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°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。

三、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、研钵和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 40mL $\times$ 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 $\times$ 1 瓶	4°C 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 $\times$ 1 支	4°C 保存	10mg 无水葡萄糖, 临用前加 1mL 蒸馏水, 配成 10mg/mL 葡萄糖标准液。

五、操作步骤：

1. 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 10mL，摇匀，即为淀粉酶原液。

2. 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) 将葡萄糖标准液用蒸馏水稀释为 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 (μL)	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	—	—	—
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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。

六、 α -淀粉酶活性计算：

1、标准曲线的绘制

以 ΔA 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 ΔA 测定带入方程得到 x (mg/mL)

2、 α -淀粉酶活性的计算

1) 按照样本鲜重计算

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。

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

2) 按照蛋白质浓度计算

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。

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

$V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中样本体积，0.25 mL； $V_{\text{样总}}$ ：提取液总体积，10mL； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本鲜重，g； T ：反应时间，5min。

七、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。