

植物 α -淀粉酶(α -AL) 活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHA6-C24	植物 α -淀粉酶(α -AL) 试剂盒	24T	常量法

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 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。

试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	常温保存
试剂二	液体 10 mL×2 瓶	2-8°C 保存
试剂三	粉剂×2 支	2-8°C 保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C 保存

溶液的配制:

- 1、试剂一: 若有黄色晶体析出, 需加热溶解后再用;
- 2、试剂二: 临用前取 1 支试剂三加入到 1 瓶试剂二中, 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 4 周;
- 3、标准品: 10 mg 无水葡萄糖。临用前加 1 mL 蒸馏水, 配成 10 mg/mL 葡萄糖标准液, 2-8°C 保存 2 周。

操作步骤:

一、样本处理

取一定量植物组织擦净水分及杂质, 剪碎后放入研钵, 加入液氮, 研磨成粉状后转移出来, 然后准确称重, 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取, 8000g, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。
- 2、标准液的稀释: 将葡萄糖标准液用蒸馏水稀释为 0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625 mg/mL 的标准溶液。
- 3、标准液稀释可参考下表:

序号	稀释前浓度 (mg/mL)	标准液体积 (μ L)	蒸馏水体积 (μ L)	稀释后浓度 (mg/mL)
1	10	20	980	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	0.0125
6	0.0125	500	500	0.00625

备注：实验中每个标准管需250 μ L 标准溶液。

4、对照管样本处理：取250 μ L 样本沸水浴5min 作为对照管使用。

5、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 (煮沸样本)	250	-	-
蒸馏水	-	-	-	250
标准溶液	-	-	250	-
置于70 $^{\circ}$ C水浴锅中准确反应15min, 冷却至室温				
试剂二	-	250	-	-
置于40 $^{\circ}$ C水浴锅中准确保温5min				
试剂一	500	500	500	500
试剂二	250	-	250	250

混匀，沸水浴10min，540nm 处读取吸光度，分别记为A 对照、A 测定、A 标准和A 空白，计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照， ΔA 标准=A 标准-A 空白。每个测定管需设一个对照管。标准曲线和空白管只需测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 测定代入方程得到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1 mg 还原糖定义为1个酶活力单位。

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

) $\div T = 2 \times x \div W$ (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1 mg 还原糖定义为1 个酶活性单位。

α -淀粉酶活性(U/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，0.25mL；V样总：提取液总体积，10mL；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：

吸光值大于1时，可以对样本进行适当稀释后测定。若吸光值过小，可以浓缩淀粉酶稀释液或者淀粉酶原液。注意同步修改计算公式。