



## $\alpha$ -淀粉酶 ( $\alpha$ -AL) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

**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：BC0610

规格：50T/24S

**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	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

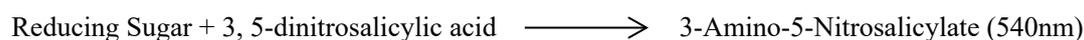
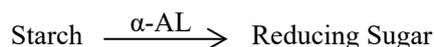
溶液的配制：

- 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保存两周。

**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。

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。 $\alpha$ -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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器和蒸馏水。

**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）**

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**

- 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 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	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 250μL 标准溶液。

4、对照管样本处理：取 250μL 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 (μL)	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°C 水浴锅中准确反应 15min，冷却至室温				
试剂二	-	250	-	-
置于 40°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  $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。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：

以标准液的浓度 (mg/mL) 为 x 轴，对应的  $\Delta A_{标准}$  为 y 轴绘制标准曲线，得到标准方程  $y = kx + b$ ，将  $\Delta A_{测定}$  带入方程中计算得到样本浓度 (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。

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

##### (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。

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

V<sub>样</sub>: 加入反应体系中样本体积，0.25mL；V<sub>样总</sub>: 提取液总体积，10mL；C<sub>pr</sub>: 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。

#### 相关发表文献:

[1] Yu Z, Yang Z, da Silva J A T, et al. Influence of low temperature on physiology and bioactivity of postharvest *Dendrobium officinale* stems[J]. *Postharvest biology and technology*, 2019, 148: 97-106.

[2] Chen M X, Zhu F Y, Wang F Z, et al. Alternative splicing and translation play important roles in hypoxic germination in rice[J]. *Journal of experimental botany*, 2019, 70(3): 817-833.

[3] QinYuan,ShangLin,YuanFu,et al. Effects of extraction methods on the physicochemical characteristics and biological activities of polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus*). *International Journal of Biological Macromolecules*. November 2018;(IF3.909)

#### 参考文献:

[1] Hashemi M, Mousavi S M, Razavi S H, et al. Comparison of submerged and solid state fermentation systems effects on the catalytic activity of *Bacillus* sp. KR-8104  $\alpha$ -amylase at different pH and temperatures[J]. *Industrial crops and products*, 2013, 43: 661-667.

#### 相关系列产品:

BC0430/BC0435 ADPG 焦磷酸化酶 (AGP) 活性检测试剂盒

BC1850/BC1855 可溶性淀粉合成酶 (SSS) 活性检测试剂盒

BC3290/BC3295 结合态淀粉合成酶 (GBSS) 活性检测试剂盒

