上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

α-淀粉酶（猪胰腺）

概述：α-淀粉酶活性的测定

本操作规程可以用来测定α-淀粉酶的活性。

分光光度终止反应测定法（A540，光程 = 1 cm）基于以下反应：

$$\text{Starch} + H_2O \xrightarrow{\text{o-amylase}} \text{Reducing Groups (Maltose)}$$

单位定义：在pH 6.9、温度20 °C条件下，一个单位可在3分钟内从淀粉中释放出1.0 mg麦芽糖。

所需试剂和设备

磷酸一氢钠

氯化钠

马铃薯淀粉

氢氧化钠

酒石酸钾钠，四水化合物

3,5-二硝基水杨酸

D-(+)-麦芽糖，一水化合物

注意事项

请参阅产品化学品安全技术说明书，获取危害和安全操作方法相关信息。

制备说明

使用超纯水（25°C时电阻率 ≥ 18 MΩ×cm）制备试剂。

缓冲液（20 °C，20 mM磷酸钠与6.7 mM氯化钠，pH 6.9）— 用超纯水制备含有2.4 mg/mL 磷酸一氢钠、和0.39 mg/mL氯化钠的溶液。 在20 °C，用1 M NaOH/1 M HCl将pH值调节为6.9。

淀粉溶液 [1.0% (w/v) 可溶性淀粉溶液] — 用缓冲液和马铃薯淀粉制备10 mg/mL的溶液：

在加热 / 搅拌器上，边搅拌边加热至沸腾15分钟使溶液完全溶解。

从加热 / 搅拌器上取下来。继续搅拌该溶液直到降至室温。

用超纯水将溶液定容。

在整个测定程序中持续搅拌溶液。

2 M氢氧化钠（NaOH）溶液 — 用超纯水和氢氧化钠制备80 mg/mL的溶液。

5.3 M酒石酸钾钠四水化合物溶液 — 用2 M氢氧化钠（NaOH）溶液和酒石酸钾钠四水化合物制备1,496 mg/mL的溶液。 将溶液放在加热/搅拌器上，边搅拌边加热使固体物质溶解。请勿加热至沸腾！

96 mM 3,5-二硝基水杨酸溶液 — 用超纯水和3,5-二硝基水杨酸制备21.9 mg/mL的溶液。 将溶液放在加热/搅拌器上，边搅拌边加热使固体物质溶解。请勿加热至沸腾！

显色剂溶液 — 制备40 mL， 加入：

将12.0 mL 温热（50–70 °C）超纯水添加至大小合适的琥珀色瓶子里。边搅拌边慢慢添加：

8.0 mL温热的5.3 M酒石酸钾钠四水化合物溶液

20.0 mL温热的96 mM 3,5-二硝基水杨酸溶液

该溶液在室温避光条件下可以保持稳定6个月。可以视需要调整制备的体积

0.2% (w/v) 麦芽糖标准溶液 — 在容量瓶里用超纯水和D-(+)-麦芽糖一水化合物制备2 mg/mL的溶液。

α-淀粉酶样品溶液 — 20 °C下用超纯水制备含有0.75-1.5 个单位/mL α-淀粉酶的溶液，制备完成后立即使用。

操作流程

最终测定浓度 — 在2.00 mL反应体积中，最终浓度为0.50% (w/v) 淀粉和约1个单位的α-淀粉酶。

1. α-淀粉酶样品测定

a. 用移液枪 (mL计) 将以下试剂转移到合适的容器中：

试剂	样品1	样品2	样品3	样品空白
淀粉溶液	1.00	1.00	1.00	1.00

b.涡旋混合并平衡至20℃。然后加入 (mL 计) :

试剂	样品1	样品2	样品3	样品空白
a-淀粉酶样品	0.50	0.70	1.00	-

c.涡旋混合并在20℃刚好孵育3.0分钟。然后加入：

试剂	样品1	样品2	样品3	样品空白
显色剂	1.00	1.00	1.00	1.00

d. 用可以排气的盖子盖好容器，放入沸水浴刚好15分钟。

e.从沸水浴中取出容器。然后添加 (mL):

试剂	样品1	样品2	样品3	样品空白
a-淀粉酶样品	0.50	0.30	-	1.00

f. 在冰上使溶液降至室温。

g. 然后添加 (mL 计) :

试剂	样品1	样品2	样品3	样品空白
超纯水	9.00	9.00	9.00	9.00

h. 倒置混合。将合适的分光光度仪在540nm 以空气归零，并记录样品和空白样品的A540读数。

2.作标准曲线

a. 用移液枪 (mL 计)将以下试剂移入合适的容器，以作出标准曲线：

试剂	标样1	标样2	标样3	标样4	标样5	标样6	标样7	空白标样
0.2%(w/v)麦芽糖标准溶液	0.05	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	2.00	-
超纯水	1.95	1.80	1.60	1.40	1.20	1.00	-	2.00
显色剂	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

说明：可以视需要添加更多的标准溶液。

b. 用可以排气的盖子盖好容器，放入沸水浴刚好15分钟。

c. 从沸水浴中取出容器。在冰上使溶液降至室温。

d.然后添加 (mL 计) :

试剂	标样1	标样2	标样3	标样4	标样5	标样6	标样7	空白标样
超纯水	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00

e.倒置混合。将合适的分光光度仪在540nm 以空气归零，并记录标样和空白标样的A540读数。

结果

计算

1.确定每个*标样*和*空白标样*之间的差值ΔA540。

ΔA540 (标样) = A540 (标样) – A540 (空白标样)

2.用线性回归法制作标准曲线，即绘制标样ΔA540与麦芽糖mg数的关系曲线。

3.确定每个*样品*和*空白样品*之间的差值ΔA540。

ΔA540 (样品) = A540 (样品) – A540 (空白样品)

4.用标准曲线确定释放的麦芽糖mg数。

5. Units/ml enzyme $= \frac{\text{(mg of maltose released) (df)}}{\text{(mL of enzyme)}}$

式中：

df = 稀释倍数

mL酶 = 在步骤1b中加入的样品mL量。

6. Units/mg solid $= \frac{\textit{units/ml enzyme}}{\textit{mg solid/ml enzyme}}$