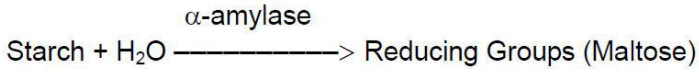
上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co.， Ltd
电话：400-666-5481　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：3008007435@qq.com

α-淀粉酶 检测

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：



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21.9mg/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 °C。然后加入 (mL计):

试剂	样品1	样品2	样品3	样品空白
α-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
α-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。

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

式中：

df = 稀释倍数

mL酶 = 在步骤1b中加入的样品mL量。

6.

$$\text{Units/mg solid} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg solid/ml enzyme}}$$