

α -淀粉酶 (α -amylase, α -AL) 试剂盒说明书

(微板法 48 样)

一、产品简介:

淀粉酶包括 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.1) 和 β -淀粉酶 (EC 3.2.1.2)。淀粉酶催化淀粉水解生成还原糖, 是生物体利用淀粉进行碳水化合物代谢的初级反应。本试剂盒采用 70°C 加热钝化 β -淀粉酶来检测 α -淀粉酶的活力。即 α -淀粉酶催化淀粉水解生成的还原糖能使 3,5-二硝基水杨酸生成棕红色得 3-氨基-5-硝基水杨酸, 在 540 nm 有吸收峰; 通过测定 540 nm 吸光度增加速率, 计算淀粉酶活性。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 4mL×1 瓶	4°C 保存	若有沉淀析出, 可 90-95°C 加热溶解后再用。
试剂二	液体 14mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵和蒸馏水。

四、 α -淀粉酶 (α -AL) 活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 组织样本: 称取约 0.2g 组织 (水分充足的样本可取 1g), 加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆, 4°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C 离心 5min; 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入经预冷的 1mL 的 80%乙醇混匀, 4°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C 离心 5min; 弃上清, 留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液, 涡旋混匀, 4°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C 离心 10min; 留上清, 弃沉淀。上清液置冰上待测。
- ② 细菌/培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 在室温下放置提取 20min, 每隔 5min 振荡 1 次, 使其充分提取; 12000rpm, 4°C 离心 10min, 上清液置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500:1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长到 540 nm。
- ② 试剂一和试剂二 40°C 预热 10min。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

试剂 (μ L)	测定管	对照管
α -淀粉酶上清液	70	70
70°C 水浴 15min 左右, 流水冷却。		
蒸馏水		70
试剂一	70	
40°C 恒温水浴中准确保温 5min。		
试剂二	140	140
混匀, 95°C 水浴 5min, 流水冷却, 取 200 μ L 至 96 孔板中, 540nm 处		

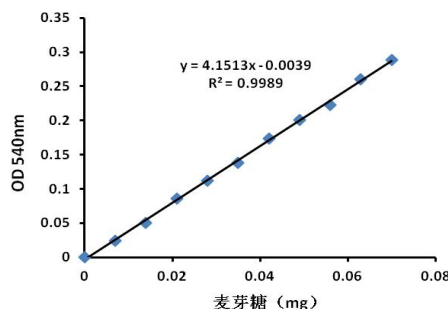
读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定管-A 对照管 (每个测定管需设一个对照管)。

【注】1. 若 ΔA 在零附近如低于 0.005, 可增加样本取样质量 W, 或增加样本加样量 V1 (如由 70 μ L 增至 100 μ L, 则试剂二相应减少, 保持总体积不变), 或延长反应时间 T (如由 5min 增至 20min), 则改变后的 W 和 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

2. 若 ΔA 值大于 1, 则可减少加样体积 V1 (如由 70 μ L 减至 20 μ L, 另补加 50 μ L 蒸馏水), 或者单独对 α -淀粉酶上清液用蒸馏水稀释后再取 70 μ L 加样测定。则改变后的 V1 和稀释倍数 D 代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 4.1513x - 0.0039$; x 为标准品质量 (mg), y 为吸光值 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

单位定义: 每克组织每分钟催化产生 1 μ g 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}}+0.0039)\div 4.1513\times 10^3]\div (W\times V1\div V)\div T\times D$$
$$=688.3\times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}}+0.0039)\div W\times D$$

3、按照蛋白质含量计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 μ g 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot})=[(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}}+0.0039)\div 4.1513\times 10^3]\div (V1\div V\times C_{\text{pr}})\div T\times D$$
$$=688.3\times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}}+0.0039)\div C_{\text{pr}}\times D$$

4、按细菌/细胞密度计算:

单位定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 μ g 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}}+0.0039)\div 4.1513\times 10^3]\div (V1\div V\times 500)\div T\times D$$
$$=1.4\times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}}+0.0039)\times D$$

5、液体样本中 α -淀粉酶活性计算:

单位定义: 每毫升液体每分钟催化产生 1 μ g 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL})=[(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}}+0.0039)\div 4.1513\times 10^3]\div V1\div T\times D$$
$$=688.3\times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}}+0.0039)\times D$$

V---提取液总体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 70 μ L = 0.07 mL;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 5min;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

1 制备标准品母液 (1mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且 -20 $^{\circ}$ C 保存)。

2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。70 μ L 标准品 + 70 μ L 蒸馏水 + 140 μ L 试剂二, 混匀, 95 度水浴 5min, 流水冷却, 取 200 μ L 至 96 孔板中, 540nm 处读取吸光值, 以标准品质量为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 即可制作标准曲线。