

α-淀粉酶(α-AL)检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-DF002-24 分光法 24 样)

有效期: 3 个月

测定意义:

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。

测定原理:

还原糖还原 3,5-二硝基水杨酸生成棕红色物质。β-淀粉酶不耐热, 在 70℃钝化 15min, 从而测定α-淀粉酶活性。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、玻璃比色皿、研钵和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

试剂一: 25mL×1 瓶, 常温保存, 若有黄色晶体析出, 需加热溶解后再用;

试剂二: 20mL×1 瓶, 4℃保存。

粗酶液提取:

1、组织样本:

称取约 0.1g 样本, 加 1mL 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; 8000g, 常温离心 10min, 吸取上清液即为淀粉酶原液。

2、细菌、细胞样本:

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; 8000g, 4℃离心 10min, 上清液置冰上待测。

3、液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

操作步骤和加样表 (在 1.5mLEP 管中依次加入下列试剂):

1、β-淀粉酶灭活:

试剂 (μL)	对照管	测定管
α-淀粉酶原液	250	250

70℃水浴 15min 左右, 冷却

蒸馏水	250	
试剂二		250

将以上对照管、测定管于 40℃恒温水浴中保温 5min

试剂一	500	500
-----	-----	-----

混匀, 沸水浴 5min, 蒸馏水调零, 540nm 处读取对照管和测定管吸光度, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

α-淀粉酶活性计算:

标准条件下测定回归曲线为 $y = 3.7215x - 0.1778$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

(1) 按照样本质量计算

单位定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\text{mg}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.1778) \div 3.7215 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.1075 \times (\Delta A + 0.1778) \div W$$

(2) 按照蛋白质含量计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(mg/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.1778) \div 3.7215 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 0.1075 \times (\Delta A + 0.1778) \div \text{Cpr}$$

(3) 液体中 α -淀粉酶活性计算

单位定义：每 mL 液体每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(mg/min/mL)} = [(\Delta A + 0.1778) \div 3.7215 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T \\ = 0.1075 \times (\Delta A + 0.1778)$$

(4) 按照细菌、细胞个数计算

单位定义：每 1 万个细胞、组织每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(mg/min/10}^4\text{ cell)} = [(\Delta A + 0.1778) \div 3.7215 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 0.000215 \times (\Delta A + 0.1778)$$

V 反总：反应体系总体积，0.5mL；V 样：加入反应体系中样本体积，0.25 mL；V 样总：提取液总体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，5min；500：细菌或细胞总数，500 万。