α-淀粉酶(α-amylase,α-AL) (淀粉-碘比色法)活性检测说明书

（货号：ADS-W-TDX067　微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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。在底物浓度已知且过量的情况下，加入碘液与未水解的淀粉结合生成蓝色复合物，根据蓝色深浅可计算出水解的淀粉量，从而计算出α-淀粉酶的酶活力大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	试剂一 A：粉体 4 支 试剂一 B：空瓶 4 个	室温保存	1. 用前把一支 A 全部倒入一个 B 空瓶中； 2. 再用 0.75mL 试剂四涮洗试剂 A 的 EP 管后全部转至 B 瓶中； 3. 再向 B 瓶中加入 3mL 试剂四（B 瓶中最终共 3.75mL 试剂四）； 4. 混匀后于 90-95 度水浴溶解至澄清状态； 5. 最好现配现用（若出现沉淀不可再使用）。
试剂二	液体 1mL×1 支	4℃避光保存	
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、α-淀粉酶（α-AL）活性检测：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 经预冷提取液，涡旋混匀，4℃放置 10min；12000rpm，4℃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℃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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 660 nm。试剂一于 37℃预热 10min。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂（μL）	测定管	空白管（仅做一次）
样本	20	
蒸馏水		20
试剂一	100	100

混匀，37℃孵育 5min		
试剂二	10	10
试剂三	100	100
蒸馏水	600	600
务必混匀，避光静置 10min 后，取出 200μL 至 96 孔板中，于 660nm 处读值，△A= A 空白- A 测定。		

【注】：1. 空白管的颜色（蓝色）最深，测定管比空白管稍浅，**若测定管无蓝色或为黄色则样本浓度偏高，需用蒸馏水或提取液稀释后测定，**稀释倍数记为 D。则稀释倍数 D 重新代入公式计算。

2. 若测定管颜色与空白管颜色接近，即ΔA 在零附近(小于 0.01)，说明样本酶活性低，则可增加样本加样量 V1（如增至 50μL，则最后一步的蒸馏水相应减少，保持总体积不变），或增加取样质量 W。则改变后的 V1 和 W 需重新代入公式计算。

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

定义：每克组织在 37℃与底物作用 30 分钟，水解 10mg 淀粉定义为 1 个酶活力单位。

α- 淀粉酶(10mg/30min/g 鲜重)=[(△A÷A 空白)×$C_{底物液}$×$V_{底物液}$]÷(W×V1÷V)÷10×(30÷T)×D

=4.8×(△A÷A 空白)÷W×D

2、按照蛋白质含量计算：

定义：每毫克组织蛋白在 37℃与底物作用 30 分钟，水解 10mg 淀粉定义为 1 个酶活力单位。

α- 淀粉酶(10mg/30min/mg prot)=[(△A÷A 空白)×$C_{底物液}$×$V_{底物液}$]÷(V1÷V×Cpr)÷10×(30÷T)×D

=4.8×(△A÷A 空白)÷Cpr×D

3、按细菌/细胞密度计算：

定义：每 1 万个细菌或细胞在 37℃与底物作用 30 分钟，水解 10mg 淀粉定义为 1 个酶活力单位。

α- 淀粉酶(10mg/30min/10^4 cell)=[(△A÷A 空白)×$C_{底物液}$×$V_{底物液}$]÷(V1÷V×500)÷10×(30÷T)×D

=4.8×(△A÷A 空白)÷500×D

4、液体样本中酶活性计算：

定义：每 100mL 液体在 37℃与底物作用 30 分钟，水解 10mg 淀粉定义为 1 个酶活单位。

α- 淀粉酶(10mg/30min/100mL)=[(△A÷A 空白)×$C_{底物液}$×$V_{底物液}$] ×(100÷V1) ÷10×(30÷T)×D

=480×(△A÷A 空白)×D

V---提取液总体积，1mL；　　V1---加入体系中样本体积，20μL =0.02 mL；

W---样本质量，g；　　T---反应时间，5min；

$C_{底物液}$—底物液浓度，**1.6mg/mL；**　　$V_{底物液}$—底物液加入量即试剂一，0.1mL；

500---细菌或细胞总数，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。