

α -淀粉酶 (α -amylase, α -AL) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-DF002 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 80mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	4°C 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 4mL 提取液, 70°C 加热溶解后再用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 14mL×1 瓶	4°C 避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C 保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

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 0.2g 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、检测步骤:

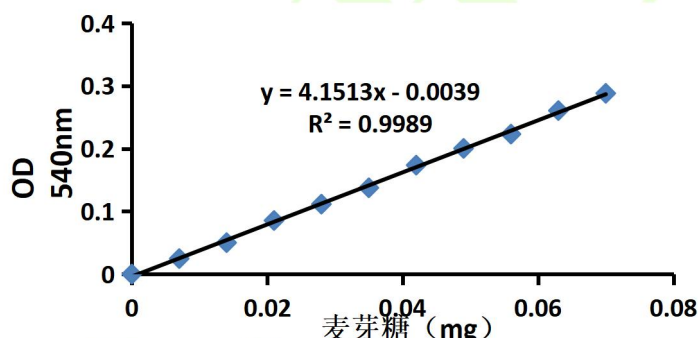
- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长到 540 nm。
- ② 试剂一和试剂二 40°C 预热 10min。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

试剂 (μL)	测定管	对照管
α- 淀粉酶上清液	70	70
70℃水浴 15min 左右, 流水冷却。		
蒸馏水		70
试剂一	70	
40℃恒温水浴中准确保温 5min。		
试剂二	140	140
混匀, 95℃水浴 5min, 流水冷却, 取 200μL 至 96 孔板中, 540nm 处读取吸光值 A, ΔA=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 70μL 增至 100μL, 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 70μL 减至 20μL, 另补加 50μL 蒸馏水), 或者单独对α- 淀粉酶上清液用蒸馏水稀释后再取 70μL 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 1μg 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 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

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

$$= 688.3 \times (\Delta A_{\alpha\text{- 淀粉酶}} + 0.0039) \div Cpr \times D$$

- 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 1μg 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 1μg 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, 70μL = 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℃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。70μL 标准品+70μL 蒸馏水+140μL 试剂二，混匀，95 度水浴 5min，流水冷却，取 200μL 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。