

α-淀粉酶 (α-amylase, α-AL) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-DF002 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

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 40mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	4°C 保存	1. 临用前加入 6mL 提取液, 70°C 加热溶解后再用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 24mL×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、所需仪器和用品:

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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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: 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 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 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长到 540 nm, 蒸馏水调零。
- ② 试剂一和试剂二 40°C 预热 10min。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

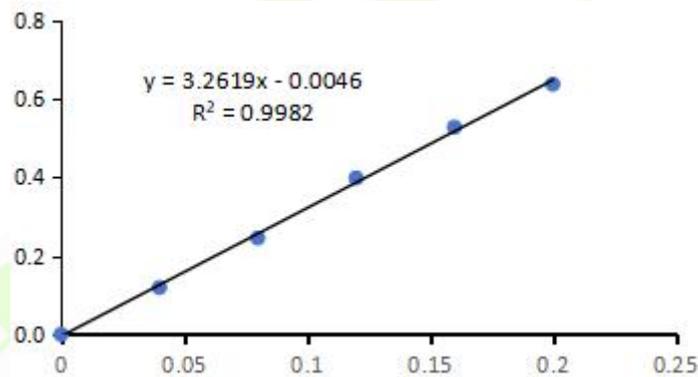
试剂 (μL)	测定管	对照管
α-淀粉酶上清液	200	200

70°C水浴 15min 左右，流水冷却。		
蒸馏水		200
试剂一	200	
40°C恒温水浴中准确保温 5min。		
试剂二	450	450
混匀, 95°C水浴 5min, 流水冷却, 全部转移至 1mL 的玻璃比色皿中, 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 0.01, 可增加样本取样质量 W, 或增加样本加样量 V1 (如由 200 μ L 增至 300 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 200 μ L 减至 50 μ L, 另补加 150 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 200 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: $y = 3.2619x - 0.0046$; 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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0046) \div 3.2619 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 306.6 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0046) \div W$$

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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0046) \div 3.2619 \times 10^3] \div (V1 \div V \times Cpr) \div T$$

$$= 306.6 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0046) \div Cpr$$

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。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0046) \div 3.2619 \times 10^3] \div (V1 \div V \times 500) \div T$$

$$= 0.613 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0046)$$

5、液体样本中 α -淀粉酶活性计算:

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

$$\alpha\text{-淀粉酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0046) \div 3.2619 \times 10^3] \div V1 \div T$$

$$= 306.6 \times (\Delta A_{\alpha\text{-淀粉酶}} + 0.0046)$$

V---提取液总体积, 1 mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 200 μ L = 0.2mL;

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 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20°C保存), 标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下:

标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	200	
蒸馏水	200	400
试剂二	450	450
混匀, 95 度水浴 5min, 流水冷却, 全部转移至 1mL 的玻璃比色皿中, 540nm 处读取吸光值, $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		