

## $\alpha$ -淀粉酶 ( $\alpha$ -amylase, $\alpha$ -AL) 试剂盒说明书

(货号: G0510W 微板法 48 样)

### 一、产品简介:

淀粉酶包括 $\alpha$ -淀粉酶 (EC 3.2.1.1) 和 $\beta$ -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  $\beta$ -淀粉酶来检测 $\alpha$ -淀粉酶的活力。即 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -淀粉酶 ( $\alpha$ -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:

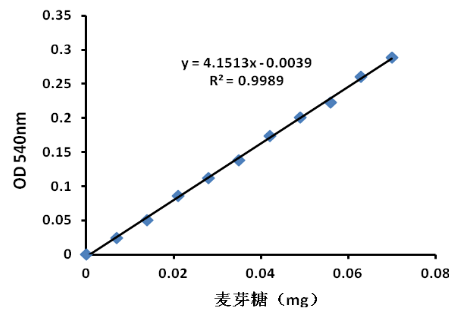
- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长到 540 nm。
- ② 试剂一和试剂二 40°C 预热 10min。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

试剂 ( $\mu$ L)	测定管	对照管
$\alpha$ -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 $\mu$ 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)。

## 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  $\Delta A$ 。



2、按照样本质量计算:

单位定义: 每克组织每分钟催化产生  $1\mu\text{g}$  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  $1\mu\text{g}$  麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

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

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

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  $1\mu\text{g}$  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  $\alpha$ -淀粉酶活性计算:

单位定义: 每毫升液体每分钟催化产生  $1\mu\text{g}$  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,  $70\mu\text{L} = 0.07 \text{ mL}$ ;

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 ( $1\text{mg}/\text{mL}$ ): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且  $-20^\circ\text{C}$  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.  $\text{mg}/\text{mL}$ 。  $70\mu\text{L}$  标准品 +  $70\mu\text{L}$  蒸馏水 +  $140\mu\text{L}$  试剂二, 混匀, 95 度水浴 5min, 流水冷却, 取  $200\mu\text{L}$  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。