

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

(货号: G0595W 微板法 96 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	试剂一 A: 粉体 mg×4 支 试剂一 B: 空瓶×4 个	室温保存	用前把一支 A 全部倒入一个 B 空瓶中, 再用 0.75mL 试剂四清洗试剂 A 的 EP 管后全部转至 B 瓶中, 再向 B 瓶中加入 3mL 试剂四 (B 瓶中最终共 3.75mL 试剂四), 混匀后于 90-95 度水浴溶解至澄清状态, 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°C保存	
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	

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、α-淀粉酶 (α-AL) 活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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, 混匀后研磨匀浆, 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 (10⁴ 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 660 nm。试剂一于 37°C 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°C 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 200 μ L 至 96 孔板中，于 660nm 处读值， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

定义：每克组织在 37 $^{\circ}$ C 与底物作用 30 分钟，水解 10mg 淀粉定义为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶}(10\text{mg}/30\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A \div A_{\text{空白}}) \times C_{\text{底物液}} \times V_{\text{底物液}}] \div (W \times V_1 \div V) \div 10 \times (30 \div T) \times D \\ = 4.8 \times (\Delta A \div A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

2、按照蛋白质含量计算：

定义：每毫克组织蛋白在 37 $^{\circ}$ C 与底物作用 30 分钟，水解 10mg 淀粉定义为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶}(10\text{mg}/30\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A \div A_{\text{空白}}) \times C_{\text{底物液}} \times V_{\text{底物液}}] \div (V_1 \div V \times C_{\text{pr}}) \div 10 \times (30 \div T) \times D \\ = 4.8 \times (\Delta A \div A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times D$$

3、按细菌/细胞密度计算：

定义：每 1 万个细菌或细胞在 37 $^{\circ}$ C 与底物作用 30 分钟，水解 10mg 淀粉定义为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶}(10\text{mg}/30\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div A_{\text{空白}}) \times C_{\text{底物液}} \times V_{\text{底物液}}] \div (V_1 \div V \times 500) \div 10 \times (30 \div T) \times D \\ = 4.8 \times (\Delta A \div A_{\text{空白}}) \div 500 \times D$$

4、液体样本中酶活性计算：

定义：每 100mL 液体在 37 $^{\circ}$ C 与底物作用 30 分钟，水解 10mg 淀粉定义为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶}(10\text{mg}/30\text{min}/100\text{mL}) = [(\Delta A \div A_{\text{空白}}) \times C_{\text{底物液}} \times V_{\text{底物液}}] \times (100 \div V_1) \div 10 \times (30 \div T) \times D \\ = 480 \times (\Delta A \div A_{\text{空白}}) \times D$$

V---提取液总体积，1mL；

V1---加入体系中样本体积，20 μ L=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。