

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

(货号: BP10012W 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 试剂四清洗试剂 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、指标测定:

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 (μ L)	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 200μL 至 96 孔板中，于 660nm 处读值， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。		

【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°C 与底物作用 30 分钟，水解 10mg 淀粉定义为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶}(10\text{mg}/30\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A \div A_{\text{空白}}) \times C_{\text{底物液}} \times V_{\text{底物液}}] \div (W \times V1 \div V) \div 10 \times (30 \div T) \times D \\ = 4.8 \times (\Delta A \div A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

2、按照蛋白质含量计算：

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

$$\alpha\text{-淀粉酶}(10\text{mg}/30\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A \div A_{\text{空白}}) \times C_{\text{底物液}} \times V_{\text{底物液}}] \div (V1 \div V \times C_{\text{pr}}) \div 10 \times (30 \div T) \times D \\ = 4.8 \times (\Delta A \div A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times D$$

3、按细菌/细胞密度计算：

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

$$\alpha\text{-淀粉酶}(10\text{mg}/30\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div A_{\text{空白}}) \times C_{\text{底物液}} \times V_{\text{底物液}}] \div (V1 \div V \times 500) \div 10 \times (30 \div T) \times D \\ = 4.8 \times (\Delta A \div A_{\text{空白}}) \div 500 \times D$$

4、液体样本中酶活性计算：

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

$$\alpha\text{-淀粉酶}(10\text{mg}/30\text{min}/100\text{mL}) = [(\Delta A \div A_{\text{空白}}) \times C_{\text{底物液}} \times V_{\text{底物液}}] \times (100 \div V1) \div 10 \times (30 \div T) \times D \\ = 480 \times (\Delta A \div A_{\text{空白}}) \times D$$

V---提取液总体积，1mL；

V1---加入体系中样本体积，20μL = 0.02 mL；

W---样本质量，g；

T---反应时间，5min；

$C_{\text{底物液}}$ —底物液浓度，1.6mg/mL；

$V_{\text{底物液}}$ —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；

C_{pr} ---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。