

α -Amylase Kit

α -淀粉酶(α -AL) (淀粉-碘比色法)活性检测说明书

货号: BN72819| 方法: 微板法|规格: 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℃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试剂四涮洗试剂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℃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、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℃放置10 min;12000 rpm,4℃离心10 min; 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1 mL 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10 s, 重复30 次);在室温下放置提取20 min, 每隔5 min振荡1次, 使其充分提取; 12000 rpm,4℃离心10 min, 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

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

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， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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。

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

2、按照蛋白质含量计算：

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

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

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。

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

4、液体样本中酶活性计算：

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

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

V---提取液总体积，1mL；

V1---加入体系中样本体积，20μL=0.02 mL；

W---样本质量，g；

T---反应时间，5min；

C底物液---底物液浓度，1.6 mg/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。