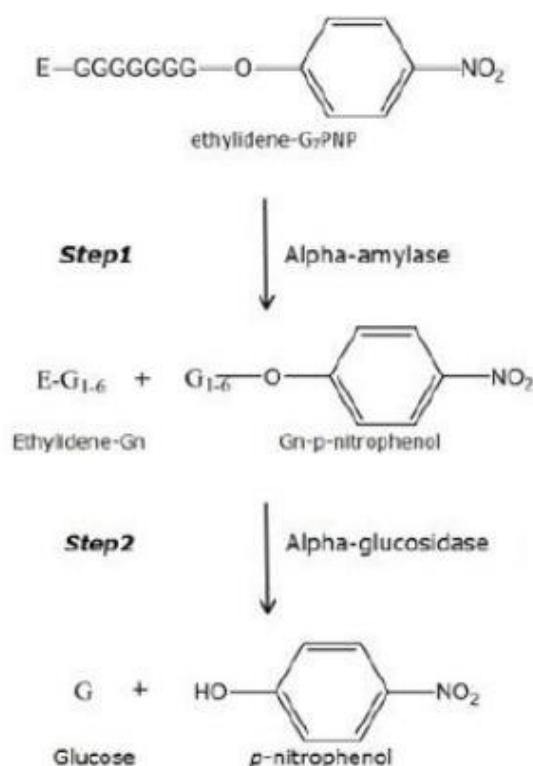


KNU(B), α -淀粉酶活力的测定, Konelab 方法

原理

样品中 α -淀粉酶和试剂盒中的 α -葡萄糖苷酶水解底物(4,6-ethylidene(G₇)-p-nitrophenyl(G₁)- α ,D-maltoheptaoside (ethylidene- G₇PNP)形成葡萄糖和黄色对硝基苯酚。
生成对硝基苯酚的比率能够被 Konelab 检测到。这反映出反应速率, 因此得到酶活力。



反应条件

参数	反应条件
温度	37.0°C
pH	7.0
底物浓度	0.86 mM
酶浓度	[3.91; 19.53] mKNU(B)/mL
反应时间	126 秒
测定时间	120 秒
波长	405nm

单位定义

α -淀粉酶活力相对于一个酶标准品测定, 酶活力单位为 KNU (B) /g。

方法参数

参数	要素
专属性	此方法对于所有能够水解 ethylidene-G ₇ PNP 生成 G ₂ PNP, G ₃ PNP, and G ₄ PNP 的酶具有专一性。钙离子能够稳定酶样品。
校准范围和正常范围	0.018 – 0.091 KNU(B)/mL
最低检测限	除了 CT 颗粒样品外, 最低检测浓度为 1.8 KNU(B)/g, 当最小溶解系数相当于 1g 样品溶解于 100mL 试剂中, 且无后续稀释。 CT 颗粒样品最低检测限为 4.5 KNU(B)/g.

仪器

仪器	品牌
Konelab 30 全自动生化分析仪	Thermo Fisher Scientific
稀释仪	E.g. Hamilton Microlab
分析天平	E.g. Mettler
天平	E.g. Mettler
pH 计	E.g. Radiometer, Mettler
纯化水	E.g. Milli-Q
磁力搅拌器	--

化学品

名称	化学式	品牌
AMYL ThermoFisher	-	TR25421 Thermo Fisher
Brij® L23 (30% w/v)	C ₁₂ E ₂₃	E.g. Sigma B4184
二水合氯化钙	CaCl ₂ , 2 H ₂ O	E.g. Sigma 31307
HEPES	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	E.g. Sigma H3375

始终检查所有化学品的材料安全数据表 (MSDS)

试剂

15% (w/v) Brij® L23

例, 制备 1L:

步骤	操作
1	称量 508.0 ± 0.4g Brij® L23 到烧杯中 注: 当 Brij® L23 不易溶解时, 可将 Brij L23 试剂瓶置于 35-45°C 水浴中加热助溶
2	加入大约 300mL 超纯水并搅拌
3	将 Brij® L23 定量地转移到 1L 容量瓶中
4	用超纯水定容至刻度
5	搅拌直到均匀
6	储存: 4°C 冰箱, 2 个月

样品缓冲液: 0.03 M CaCl₂, 10 mM HEPES, 0.045% (v/v) Brij® L23

例, 制备 5L:

步骤	操作
1	称量 11.92 g ± 0.1 g HEPES
2	称量 22.05 ± 0.1 g CaCl ₂
3	定量转移至 5L 容量瓶
4	加入约 90 %总容量的去离子水, 搅拌至溶解
5	加入 15 mL 15% (w/v) Brij® L23 至容量瓶中
6	去离子水定容至刻度
7	搅拌至完全溶解
8	储存: 室温, 4 周

底物: Amyl kit, α-glucosidase & 4, 6 ethylidene-G7PNP (Konelab reagent)

步骤	操作
1	此试剂采购后可直接使用
2	储存: 4°C 冰箱, 开放后参考试剂保质期

标准品

标准品在有需求时可供

步骤	操作																																								
1	称量相当于 228 单位的标准品																																								
2	将标准品用样品缓冲液溶解于 250 mL 容量瓶中																																								
3	磁力搅拌 15 - 90 分钟 储存: 室温, 24 小时																																								
4	工作溶液: 标准品工作溶液用样品缓冲液在稀释仪上直接稀释标准品储备液到样品杯中。标准曲线为 7 个点的标准曲线, 最高点和最低点的浓度比为 5.0																																								
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>标准点</th> <th>稀释倍数</th> <th>标准储备液 (μL)</th> <th>稀释缓冲液 (μL)</th> <th>浓度 KNU(B)/mL</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>50</td> <td>24</td> <td>1176</td> <td>0.018</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>30</td> <td>40</td> <td>1160</td> <td>0.030</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>25</td> <td>48</td> <td>1152</td> <td>0.036</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>20</td> <td>60</td> <td>1140</td> <td>0.046</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>15</td> <td>80</td> <td>1120</td> <td>0.061</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>12</td> <td>100</td> <td>1100</td> <td>0.076</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>10</td> <td>120</td> <td>1080</td> <td>0.091</td> </tr> </tbody> </table>	标准点	稀释倍数	标准储备液 (μL)	稀释缓冲液 (μL)	浓度 KNU(B)/mL	1	50	24	1176	0.018	2	30	40	1160	0.030	3	25	48	1152	0.036	4	20	60	1140	0.046	5	15	80	1120	0.061	6	12	100	1100	0.076	7	10	120	1080	0.091
标准点	稀释倍数	标准储备液 (μL)	稀释缓冲液 (μL)	浓度 KNU(B)/mL																																					
1	50	24	1176	0.018																																					
2	30	40	1160	0.030																																					
3	25	48	1152	0.036																																					
4	20	60	1140	0.046																																					
5	15	80	1120	0.061																																					
6	12	100	1100	0.076																																					
7	10	120	1080	0.091																																					
	储存: 制备后立即分析																																								

控制样品

每一个分析序列中建议包含一个控制样品。用以下配制样品相同的程序制备控制样品

除 CT 颗粒样品外的样品

步骤	操作
1	称量约 0.28-1.00g 样品
2	用样品缓冲液将样品溶解于容量瓶中
3	磁力搅拌约 15 - 90 分钟 储存: 室温, 24 小时
4	用样品缓冲液进一步稀释样品 最终稀释液的活力应约为 0.055 KNU(B)/mL
5	储存: 立即使用

CT 颗粒样品

步骤	操作
1	称量 0.28-1.00g 样品
2	用样品缓冲液将样品溶解于容量瓶中,先定容至容量瓶的¾处 注意: 只能使用 250 mL 容量瓶
3	磁力搅拌 1 小时 45 分钟
4	用样品缓冲液定容至刻度, 搅拌 15-30 分钟 储存: 室温, 24 小时
5	用样品缓冲液进一步稀释样品 最终稀释液的活力应约为 0.055 KNU(B)/mL
6	储存: 立即使用

空白

此方法无试剂空白

程序

步骤	操作								
1	准备试剂、标准品、控制样品和样品								
3	将试剂置于 Konelab: <table border="1" style="width: 100%; margin-top: 5px;"> <thead> <tr> <th>试剂</th> <th>Konelab 试剂名称</th> <th>试剂瓶体积 (mL)</th> <th>试剂瓶稳定性</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>底物</td> <td>KNU(B)-SUB</td> <td>10</td> <td>6 小时</td> </tr> </tbody> </table>	试剂	Konelab 试剂名称	试剂瓶体积 (mL)	试剂瓶稳定性	底物	KNU(B)-SUB	10	6 小时
试剂	Konelab 试剂名称	试剂瓶体积 (mL)	试剂瓶稳定性						
底物	KNU(B)-SUB	10	6 小时						
4	按照标准品、控制样品和样品的顺序摆放。每个分析序列可分析20个样品								
5	开启 Konelab 开始分析								

计算

步骤	操作
1	酶样品活力通过标准曲线测定
2	基于酶标准品的测定, 拟合一条线性标准曲线, 酶活力作为 X 轴, 吸光值作为 Y 轴
3	稀释样品的酶活力通过标准曲线读出。样品酶活力通过以下公式计算: $\text{酶活力 KNU(B)/g} = \frac{S \times V \times F}{W}$ S=从标准曲线上读出, KNU(B)/mL V=容量瓶体积, mL F=二次稀释的稀释倍数 W=样品重量, g
4	例: 0.5196 g 样品溶解于 100 mL 容量瓶中, 使用稀释仪稀释 25 倍 Konelab 测得 ABS/min 为 0.2300 曲线读出 0.0522 KNU(B)/mL 经计算出活力: $\text{Activity} = \frac{0.0522 \cdot 100 \cdot 25}{0.5196} = 251 \text{ KNU(B)/g}$

分析序列的批准

标准曲线:

参数	必要条件
曲线拟合 (R^2)	≥ 0.9945
曲线外观	线性递增的标准曲线

控制样品:

参数	必要条件
控制样品	标称值 $\pm 2SD$

样品:

参数	必要条件
样品	除 CT 颗粒样品外的样品, 分析结果 (分别在两条标准曲线上分析两个称重的样品) 需使变异系数 $CV \leq 4.0\%$ CT 颗粒样品, 分析结果 (分别在两条标准曲线上分析两个称重的样品) 需使变异系数 $CV \leq 12\%$

分析结果声明

结果需保留三位有效数字。

方法设置

Konelab 测试定义

Tick length (sec)	4.5				
Full name	KNU(B)				
Online Name	KNU(B)	Test In Use	YES		
Test type	Photometric		LOW	HIGH	
		Test limit	*	*	Abs/min
Result unit	Abs/min	Initial absorbance	0.000	*	A
Number of Decim.	5	Dilution limit	*	*	Abs/min
		Secondary dil 1+	0.0	0.0	
		Critical limit	*	*	Abs/min
		Reflex test limit	*	*	Abs/min
		Reflex test			
Acceptance	Automatic	Reference class	LOW	HIGH	In Use
Dilution 1+	0.0				
Sample type	Sample type 5	Correction factor	1.00		
		Correction bias	0.00	Abs/min	
		Temperature	37.0	°C	
Calibration type	None				
Factor	1.00	Bias		0.00	
Bias correction in use	NO				
Manual QC in Use	NO	Routine QC in Use		NO	
Blank	None	Normal cuvette			
Reagent	KNU(B)-SUB	Volume(ul)		110	
Disp. With	Extra	Add. Volume(ul)		10	
Wash reagent	KNU(B)-SUB				
Reagent wash	Before dispense				
Syringe speed	Slow				
Incubation		Time (sec)		480	
Sample		Volume(ul)		30	
Disp. With	Extra	Add. Volume(ul)		50	
Dilution with	Water	Wash reagent		Water	
Incubation		Time (sec)		126	
Measurement	Kinetic				
Wavelength (nm)	405 nm	Side wavel. (nm)		None	
Curve type	Nonlinear				
Nonlinearity limits					
Conc. (Abs/min)	0.00000	Percent (%)		10	
Time (sec)	120	Points and intervals		7/18.0 (sec)	

试剂定义

Reagent	KNU(B)-SUB	Lot	Expiry date (dd/mm/yyyy)
Stable on board (days)	1		
Alarm limit (ml)	1.0		
Information			
Vial volume	10 ml		
Barcode id			
Syringe speed	Slow		

酶和化学品的处理

酶和酶溶液应在通风橱或密闭容器中处理。

不适当地处理酶和酶溶液会导致气溶胶及酶粉尘的产生。

应该避免酶粉尘及气溶胶的吸入，避免其对皮肤和眼睛的接触。

化学品及废弃物的处理必须按照有效的程序执行。

有效性

自 2021 年 3 月起生效

About Novozymes

Novozymes is the world leader in biological solutions. Together with customers, partners and the global community, we improve industrial performance while preserving the planet's resources and helping build better lives. As the world's largest provider of enzyme and microbial technologies, our bioinnovation enables higher agricultural yields, low-temperature washing, energy-efficient production, renewable fuel and many other benefits that we rely on today and in the future. We call it Rethink Tomorrow.

Luna no. 2020-09222-02

Novozymes A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd
Denmark

Laws, regulations, and/or third-party rights may prevent customers from importing, using, processing, and/or reselling the products described herein in a given manner. Without separate, written agreement between the customer and Novozymes to such effect, information provided in this document "AS IS" is of good faith and does not constitute a representation or warranty of any kind and is subject to change without further notice.

novozymes.com