

# 组织及血液 $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -AL) 活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHA6-M48	组织及血液 $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -AL) 试剂盒	48T	微量法

## 产品说明：

淀粉水解酶，包括 $\alpha$ -淀粉酶和 $\beta$ -淀粉酶。 $\alpha$ -AL (EC 3.2.1.1)随机催化淀粉中 $\alpha$ -1,4-糖苷键水解，生成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、糊精等还原糖，同时使淀粉的粘度降低，因此又称为液化酶。

淀粉水解酶催化淀粉水解生成还原糖，还原糖还原3,5-二硝基水杨酸生成棕红色物质，在540nm有吸收峰；通过测定540nm吸光度增加速率，计算淀粉酶活性。 $\alpha$ -AL耐热，但是 $\beta$ -淀粉酶可在70℃钝化15min。因此粗酶液经过70℃钝化15min，就只有 $\alpha$ -AL能够催化淀粉水解。

## 试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体20 mL×1 瓶	常温保存
试剂二	液体5 mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×2 支	2-8℃保存
标准品	粉剂×1支	2-8℃保存

## 溶液的配制：

- 1、试剂一：若有黄色晶体析出，需加热溶解后再用；
- 2、试剂二：临用前取1支试剂三加入1瓶试剂二中，置于常温水并加热至煮沸，期间不断搅拌粉剂至溶解，用不完的试剂2-8℃保存4周；
- 3、标准品：10 mg 无水葡萄糖。临用前加1 mL 蒸馏水，配成10 mg/mL 葡萄糖标准液，2-8℃保存2周。

## 操作步骤：

### 一、样本处理

称取约0.1g 样本，加0.8mL 蒸馏水匀浆；匀浆后在室温下放置提取15min，每隔5min 振荡1次，使其充分提取；6000g，室温离心10min，吸取上清液并且加蒸馏水定容至10mL，摇匀，即为淀粉酶原液。

### 二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热30min 以上，调节波长至540 nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、标准液的稀释：将葡萄糖标准液用蒸馏水稀释为0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0.0078 mg/mL 的标准溶液。
- 3、标准液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 (mg/mL)	标准液体积 ( $\mu$ L)	蒸馏水体积 ( $\mu$ L)	稀释后浓度 (mg/mL)
1	10	50	950	0.5

2	0.5	200	200	0.25
3	0.25	200	200	0.125
4	0.125	200	200	0.0625
5	0.0625	200	200	0.03125
6	0.03125	200	200	0.015625
7	0.015625	200	200	0.0078

备注：实验中每个标准管需75 $\mu$ L 标准溶液。

4、对照管样本处理：取250 $\mu$ L 样本沸水浴5min 作为对照管使用。

5、按照操作表依次加入各个试剂：

试剂 ( $\mu$ L)	对照管	测定管	标准管	空白管
$\alpha$ -淀粉酶原液	75 (煮沸样本)	75	-	-
蒸馏水	-	-	-	75
标准溶液	-	-	75	-
置于70 $^{\circ}$ C水浴锅中准确反应15min, 冷却至室温				
试剂二	-	75	-	-
置于40 $^{\circ}$ C水浴锅中准确保温5min				
试剂一	150	150	150	150
试剂二	75	-	75	75

混匀，沸水浴10min，取200 $\mu$ L 至96孔板或微量比色皿中，540nm 处读取吸光度，分别记为A 对照、A 测定、A 标准和A 空白，计算 $\Delta A$  测定=A 测定-A 对照， $\Delta A$  标准=A 标准-A 空白。每个测定管需设一个对照管。标准曲线 和空白管只需测1-2次。

### 三、 $\alpha$ -淀粉酶活性计算

1、标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度(x, mg/mL)和吸光度 $\Delta A$ 标准(y,  $\Delta A$ 标准)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A$ 测定代入方程得到x(mg/mL)。

2、 $\alpha$ -淀粉酶活性的计算：

(1) 按照样本质量计算

单位定义：每g 组织每分钟催化产生1mg 还原糖定义为1个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(U/g 质量)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2 \times x \div W$$

(2) 按照蛋白质浓度计算

单位定义：每mg 组织蛋白每分钟催化产生1mg 还原糖定义为1个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性(U/mg prot)} = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.2 \times x \div C_{\text{pr}}$$

V样：加入反应体系中样本体积，0.075mL；V样总：提取液总体积，10mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，5min。

#### 注意事项：

测定的吸光值大于1.5时，可以对样本进行适当稀释后测定。若吸光值过小，可以浓缩淀粉酶稀释液或者淀粉酶原液。注意同步修改计算公式。