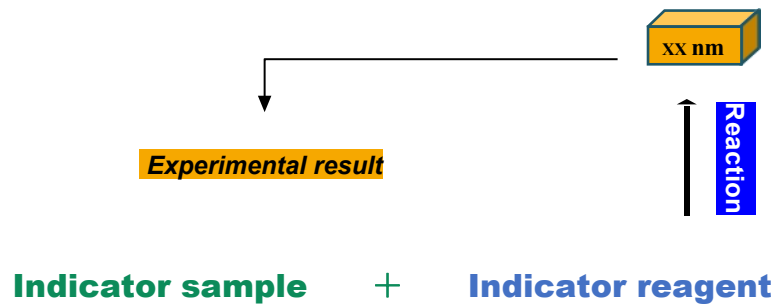


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

α -淀粉酶检测试剂盒说明书

微量法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 20mL×1 瓶	室温保存	若有黄色晶体析出，可适当加热溶解后再用
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 10mL 蒸馏水，置于常温水中并加热至煮沸，期间不断搅拌粉剂至溶解。
标准品	粉剂×1 支，10mg 无水葡萄糖	4℃保存	临用前加 1mL 蒸馏水，配成 10mg/mL 葡萄糖标准液

产品说明：

淀粉水解酶，包括 α -淀粉酶和 β -淀粉酶。 α -AL (EC 3.2.1.1) 随机催化淀粉中 α -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 540 nm 有吸收峰；通过测定 540 nm 吸光度增加速率，计算淀粉酶活性。 α -AL 耐热，但是 β -淀粉酶可在 70℃ 钝化 15min。因此粗酶液经过 70℃ 钝化 15min，就只有 α -AL 能够催化淀粉水解。

需自备的仪器和用品：

酶标仪或可见分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、96 孔板/微量比色皿、研钵和蒸馏水。

操作步骤：

一、粗酶液提取：

称取约 0.1g 样本，加 0.8 mL 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 10 mL，摇匀，即为淀粉酶原液。

二、测定步骤和加样表（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 540 nm，蒸馏水调零。
- 2、将葡萄糖标准液用蒸馏水稀释为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0.0078 和 0.0039mg/mL 的标准溶液。

3、按操作表依次加入各试剂：

试剂 (μL)	对照管	测定管	标准管	空白管
α-淀粉酶原液	75	75	-	-
蒸馏水	-	-	-	75
标准溶液 (mg/mL)	-	-	75	-
70°C水浴 15min 左右，冷却				
试剂一	150	-	-	-
将以上对照管、测定管和试剂二置于 40°C恒温水浴中保温 10min 左右				
试剂二	75	75	75	75
在 40°C恒温水浴中准确保温 5min				
试剂一	-	150	150	150

混匀，90°C 水浴 10min，取 200 μL 至 96 孔板或微量比色皿中，540nm 处读取对照管、测定管、标准管、空白管的吸光度，分别记为 A 对照、A 测定、A 标准和 A 空白，计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。

三、α-淀粉酶活性计算：

1、标准曲线的绘制

以 $\Delta A_{标准}$ 为 y 轴，以标准溶液浓度为 x 轴，绘制标准曲线，得到方程 $y=kx+b$ 。将 $\Delta A_{测定}$ 带入方程得到 x (mg/mL)。

2、α-淀粉酶活性的计算

a. 按照样本鲜重计算

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。

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

b. 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。

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

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

注意事项：

当测定的吸光值大于 1.5 时，可以对样本进行适当稀释后测定。