

α -淀粉酶 (α -amylase, α -AL) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：正式测定前请取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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°C 钝化 15min。因此粗酶液经过 70°C 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：

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

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 15mL×1 瓶，室温保存。若有黄色晶体析出，可 90°C 加热溶解后再用。

试剂二：液体 7.5mL×1 瓶，4°C 保存。若有沉淀析出，可 70°C 加热溶解后使用。

粗酶液提取：

组织：称取 0.1~0.2g 样本（建议称取约 0.1g 样本），加 1 mL 蒸馏水匀浆；将匀浆倒入离心管中，在室温下放置提取 15min，每隔 5min 振荡 1 次，使其充分提取；3000g，25°C 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。

血清（浆）：直接检测。

操作步骤和加样表（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 540 nm，蒸馏水调零。
- 2、试剂一和试剂二 40°C 预热 10min。
- 3、测定步骤：

试剂 (μ L)	对照管	测定管
α -淀粉酶原液	75	75

70°C 水浴 15min 左右，流水冷却。

蒸馏水	75	
试剂二		75

在 40°C 恒温水浴中准确保温 5min

试剂一	150	150
-----	-----	-----

混匀，95 度水浴 5min，冷却，取 200 μ L 至微量石英比色皿或 96 孔板中，540nm 处读取吸光值，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

α -淀粉酶活性计算:

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归曲线为 $y=3.7215x-0.1778$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

2、 α -淀粉酶活性

(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。

α -淀粉酶活性 (mg/min/g 鲜重) = $[(\Delta A + 0.1778) \div 3.7215 \times V_{反总}] \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div T = 1.075 \times (\Delta A + 0.1778) \div W$

(2) 按照蛋白质含量计算

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。

α -淀粉酶活性 (mg/min/mg prot) = $[(\Delta A + 0.1778) \div 3.7215 \times V_{反总}] \div (V_{样} \times C_{pr}) \div T = 0.1075 \times (\Delta A + 0.1778) \div C_{pr}$

(3) 血清 (浆) 样本中 α -淀粉酶活性计算

单位定义: 每 mL 血清 (浆) 每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活性单位。

α -淀粉酶活性 (mg/min/mL) = $[(\Delta A + 0.1778) \div 3.7215 \times V_{反总}] \div V_{样} \div T = 0.1075 \times (\Delta A + 0.1778)$

V 反总: 反应体系总体积, 0.15mL; 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: 样本质量, g; T: 反应时间, 5min。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归曲线为 $y=2.481x-0.1778$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

2、 α -淀粉酶活性

(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。

α -淀粉酶活性 (mg/min/g 鲜重) = $[(\Delta A + 0.1778) \div 2.481 \times V_{反总}] \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div T = 1.612 \times (\Delta A + 0.1778) \div W$

(2) 按照蛋白质含量计算

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。

α -淀粉酶活性 (mg/min/mg prot) = $[(\Delta A + 0.1778) \div 2.481 \times V_{反总}] \div (V_{样} \times C_{pr}) \div T = 0.1612 \times (\Delta A + 0.1778) \div C_{pr}$

(3) 血清 (浆) 样本中 α -淀粉酶活性计算

单位定义: 每 mL 血清 (浆) 每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活性单位。

α -淀粉酶活性 (mg/min/mL) = $[(\Delta A + 0.1778) \div 2.481 \times V_{反总}] \div V_{样} \div T = 0.1612 \times (\Delta A + 0.1778)$

V 反总: 反应体系总体积, 0.15mL; 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: 样本质量, g; T: 反应时间, 5min。