

α-淀粉酶 (α-amylase, α-AL) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

淀粉酶负责水解淀粉, 包括 α-淀粉酶和 β-淀粉酶。α-淀粉酶(EC 3.2.1.1)可随机地作用于淀粉中的 α-1,4-糖苷键, 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:

还原糖还原 3,5-二硝基水杨酸生成棕红色物质。β-淀粉酶不耐热, 在 70℃钝化 15min, 从而测定 α-淀粉酶活性。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、玻璃比色皿、研钵和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

试剂一: 25mL×1 瓶, 常温保存, 若有黄色晶体析出, 需 90℃加热溶解后再用;

试剂二: 20mL×1 瓶, 4℃保存, 若有沉淀析出, 需 70℃加热溶解后再用。

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℃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 1.5mLEP 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、试剂一或试剂二 40℃预热 10min
- 3、测定步骤

试剂 (μL)	对照管	测定管
α-淀粉酶原液	250	250

70℃水浴 15min 左右, 冷却

蒸馏水	250	
试剂二		250

在 40℃恒温水浴中准确保温 5min

试剂一	500	500
-----	-----	-----

混匀, 95℃水浴 5min, 冷却, 540nm 处读取对照管和测定管吸光度, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

α-淀粉酶活性计算:

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) = $[(\Delta A + 0.1778) \div 3.7215 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.075 \times (\Delta A + 0.1778) \div W$

(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。

订购电话: 0512-62956165 技术支持: 18015581827 投诉电话: 18112525205

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

(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) = $[(\Delta A + 0.1778) \div 3.7215 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T = 0.1075 \times (\Delta A + 0.1778)$

V 反总: 反应体系总体积, 0.5mL; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.25 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。