

## α-淀粉酶（α-amylase, α-AL）试剂盒说明书

微量法 100管/48样

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。

### 自备仪器和样品：

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（μL）	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 $\mu$ 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。

### $\alpha$ -淀粉酶 ( $\alpha$ -amylase, $\alpha$ -AL) 试剂盒说明书活性计算:

#### 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、 $\alpha$ 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。

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

##### (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。

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

##### (3) 血清（浆）样本中 $\alpha$ 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。

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

反总：反应体系总体积，0.15mL； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中样本体积，0.075 mL； $V_{\text{样总}}$ ：提取液总体积，10 mL； $C_{\text{pr}}$ ：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、 $\alpha$ 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。

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

##### (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。

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

##### (3) 血清（浆）样本中 $\alpha$ 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。

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

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.15mL； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中样本体积，0.075 mL； $V_{\text{样总}}$ ：提取液总体积，10 mL； $C_{\text{pr}}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL； $W$ ：样本质量，g； $T$ ：反应时间，5min。

