

α-淀粉酶活性检测试剂盒

α-AL Assay Kit

微量法

产品编号: AK421M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK421-A	18mL×1 瓶	室温保存。若有黄色晶体析出, 可90℃加热溶解后再用。
AK421-B	7.5mL×1 瓶	4℃保存。若有沉淀析出, 可70℃加热溶解后使用。
AK421-标准品	粉剂×1 支	临用前加 1 mL 蒸馏水, 配成 10 mg/mL 葡萄糖标准液; 4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 淀粉水解酶, 包括α-淀粉酶和β-淀粉酶。α-淀粉酶 (α-amylase, 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。

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℃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。

自备用品:

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。

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。

测定步骤:

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. 标准液的稀释: 将葡萄糖标准液用蒸馏水稀释为 1.25、1、0.75、0.5、0.25、0.1 mg/mL 的标准溶液。
3. AK421-A 和 AK421-B 40℃预热 10min。
4. 测定步骤 (在 EP 管中依次加入下列试剂):

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
α-淀粉酶原液	75	75		
标准溶液			75	
蒸馏水				75
70℃水浴 15min 左右, 流水冷却。				
蒸馏水	75		75	75
AK421-B		75		
在 40℃恒温水浴中准确保温 5min				
AK421-A	150	150	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，分别记为 A 对照、A 测定、A 标准和 A 空白，计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照， ΔA 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。

α -淀粉酶活性计算：

1. 标准曲线的绘制：

以标准液的浓度 (mg/mL) 为 x 轴，对应的 ΔA 标准为 y 轴绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定代入方程中计算得到样本浓度 (x, mg/mL)。

2. α -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。

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

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