

## 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℃ 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:

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℃ 加热溶解后再用。

试剂二: 液体 7.5mL×1 瓶, 4℃ 保存。若有沉淀析出, 可 70℃ 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℃ 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℃ 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℃ 水浴 15min 左右, 流水冷却。

蒸馏水	75	
试剂二		75

在 40℃ 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 μL 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) =  $[(\Delta A + 0.1778) \div 3.7215 \times V_{反总}] \div V_{样} \div T = 0.1075 \times (\Delta A + 0.1778) \div V_{反总}$   
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；  $C_{pr}$ ：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、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) =  $[(\Delta A + 0.1778) \div 2.481 \times V_{反总}] \div V_{样} \div T = 0.1612 \times (\Delta A + 0.1778) \div V_{反总}$   
 $V_{反总}$ ：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；  $C_{pr}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL；  $W$ ：样本质量，g；  $T$ ：反应时间，5min。