

## $\alpha$ -淀粉酶 ( $\alpha$ -amylase, $\alpha$ -AL) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

**注 意：**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  $\alpha$ -淀粉酶和  $\beta$ -淀粉酶。 $\alpha$ -淀粉酶(EC 3.2.1.1)可随机地作用于淀粉中的  $\alpha$ -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。 $\beta$ -淀粉酶不耐热，在 70℃钝化 15min，从而测定  $\alpha$ -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（ $\mu$ L）	对照管	测定管
$\alpha$ -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  $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

### $\alpha$ -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、  $\alpha$ -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。

$\alpha$ -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。

$\alpha$ -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  $\alpha$ -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。

$\alpha$ -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。