

α-淀粉酶抑制筛选试剂盒

规格：微量法 48 样

检测波长：405nm

编号：ml300863

线性范围：10%-80%

注 意：正式测定前务必取 3 - 5 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。是人体内负责将淀粉分解为糖的关键消化酶，因此开发α-淀粉酶抑制剂在治疗糖尿病相关研究、天然产物开发、药物发现和基础酶学研究领域扮演着至关重要的角色。

测定原理：

α-淀粉酶催化底物反应生成有色产物，其在 405 nm 处吸光度上升，加入抑制剂后会抑制α-淀粉酶酶活，吸光度上升的速率会降低，根据吸光度差值可计算出抑制率。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂名称	规格	数目	贮藏	备注
试剂一	液体 70mL	x1	4°C	
试剂二	粉剂	x1	-20°C	临用前加入 3mL 试剂一混匀
试剂三	液体 1mL	x1	-20°C,避光	5mmol/L 测定抑制率可作为参考 IC50 约为 250μmol/L
试剂四	粉剂	x1	-20°C,避光	临用前加 5ml 水溶解，避免反复冻融

样品处理:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 按照组织质量 (g): 试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一), 进行冰浴匀浆。8000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、液体样品: 直接检测。

操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm

2. 试剂二置于冰盒上待用。阳性对照孔测定的为 α -淀粉酶特异性抑制剂阿卡波糖的抑制率, 仅可作为参考, 实际测定过程中可选做孔, 在本试剂盒中的 IC₅₀ 约在 250 μ mol/L, 实测数据会有差异。

3. 在 96 孔板中依次加入:

(μ L)	总酶活孔 (只做一孔)	阳性对照孔 (选做)	测定孔
试剂一	55	-	-
试剂二	55	55	55
试剂三	-	55	-
样本	-	-	55
试剂四	90	90	90
酶标仪 405nm 处测定吸光值 A1, 37°C 孵育 20min 后测定吸光值 A2 $\Delta A = A2 - A1$			

α-淀粉酶活性抑制率计算:

1. 抑制率计算公式:

$$\text{抑制率(\%)} = (\Delta A_{\text{总}} - \Delta A_{\text{测}}) \div \Delta A_{\text{总}} \times 100\%$$

ΔA 总: 总酶活孔 OD 值;

ΔA 测: 测定孔 OD 值;

备注: 抑制率在 10%-80%区间内呈线性, 超过 80%, 抑制率曲线会渐趋平缓, 如果需要在线性范围内测定抑制率, 需要提前做预实验, 选取合适的稀释倍数或样本量

2. IC50 计算

IC50, 即抑制剂半抑制浓度。对于确定对α-淀粉酶有抑制作用的样本, 可配制成适当的浓度梯度, 分别以样本浓度为横坐标, 以抑制率为纵坐标做标准曲线, 以此计算得到抑制率为 50%时的样本浓度, 即 IC50。

预实验的意义:

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达处理的样本);
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;
- 5、通过 3 - 5 组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。