

α -淀粉酶 (α -amylase, α -AL) 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号: BP10272W

注意: 请在试剂盒保质期内使用, 具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用, 不能用于临床诊断。

检测范围: 0.05-1.4mg/mL

灵敏度: 0.05mg/mL

有效期: 6个月

保存温度: 常温和 2-8°C

检测原理:

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色物质，在 540 nm 有吸收峰，可计算淀粉酶活性。 α -淀粉酶耐热，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 -淀粉酶能够催化淀粉水解。

注意事项:

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

试剂盒组分：

试剂名称	规格（48T/21S）	规格（96T/45S）	保存条件
试剂一	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	2-8℃
试剂二	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	常温，避光
标准品	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、水浴锅、振荡器。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**, 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 0.05-1.4mg/mL, 如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩, 样本的稀释液为蒸馏水。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议做预实验验证其检测有效性。
3. **组织样本**: 称取 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; 10000 g, 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。
4. **血清(浆)等液体样本**: 直接测定。若浑浊, 离心后取上清检测。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. **标准品溶液的配制:** 使用前取一支加 1mL 蒸馏水，配置成 10mg/mL 标准品母液，2-8℃保存 2 周。把标准品母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mg/mL。（注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从标准品母液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。）

编号	①	②	③	④	⑤	⑥
标准品浓度($\mu\text{mol/mL}$)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
10mg/mL 标准品(μL)	0	20	40	60	80	100
蒸馏水(μL)	1000	980	960	940	920	900

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用蒸馏水稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。
2. 试剂一、二: 临用前 40℃ 预热 10min, 试剂二如果有固体析出, 需 70-80℃ 水浴加热溶解, 流水冷却至 40℃ 后待用。
3. 样本测定 (在 EP 管中依次加入):

标曲操作表	试剂名称(μL)	标准管	
	不同浓度标准品	75	
	试剂一	75	
	试剂二	150	
混匀, 95℃ 水浴 5min (推荐使用防爆夹, 防止爆盖), 流水冷却后, 取 200 μL 到 96 孔板中, 于 540nm 处测定 OD 值。			
样本操作表	试剂名称(μL)	测定管	对照管
	样本	75	75
	70℃ 水浴 15min, 流水冷却		
	蒸馏水		75
	试剂一	75	
	40℃ 准确反应 5min		
	试剂二	150	150
混匀, 95℃ 水浴 5min (推荐使用防爆夹, 防止爆盖), 流水冷却后, 取 200 μL 到 96 孔板中, 于 540nm 处测定 OD 值。			

注:

1. 显色完成后, 若有沉淀, 可室温条件下 4000 g 离心 5min, 取上清测定。
2. 当 ΔA 测定大于 0.747 时, 需要适当稀释。
3. 每一个测定管需设置一个对照管。

实验结果结算：

1. 标准品拟合曲线： $y=ax+b$ 。

2. 血清、唾液样本的结果计算：

定义：每毫升血清、唾液每分钟催化产生 1mg 还原糖为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活力(U/mL)}=(\Delta A-b)\div a\times V_{\text{酶促}}\div T\div V_{\text{反}}\times N$$

3. 组织样本的结果计算：

定义：每克组织每分钟催化产生 1mg 还原糖为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活力(U/g 组织)}=(\Delta A-b)\div a\times V_{\text{酶促}}\div T\div W\times V_{\text{样}}\div V_{\text{反}}\times N$$

4. 蛋白质含量计算：

定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1mg 还原糖为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活力(U/mg prot)}=(\Delta A-b)\div a\times V_{\text{酶促}}\div T\div V_{\text{反}}\times N\div Cpr$$

注：

y: 标准管 OD 值-空白管 OD 值
(标准品浓度为 0 的 OD 值)

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

x: 标准品的浓度

Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL

$V_{\text{反}}$: 加入反应体系的样本体积, 0.075mL

ΔA : 测定管 OD 值-对照管 OD 值

$V_{\text{样}}$: 组织样本制备的体积, 10mL

$V_{\text{酶促}}$: 酶促反应体积, 0.15mL

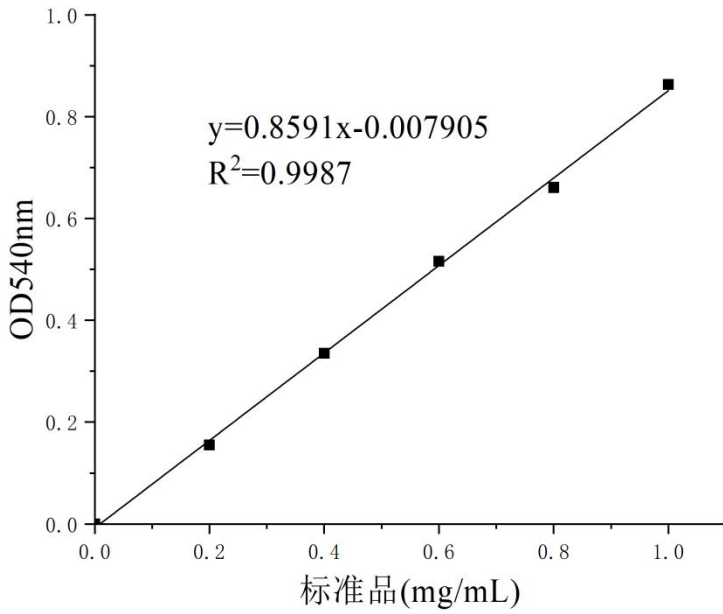
W: 样本质量, 0.1g

T: 酶促反应时间, 5min

N: 样本稀释倍数

参考曲线:

$y=0.8591x-0.007905, R^2=0.9987$, x 是标准品的浓度 (mg/mL), y 是 ΔA 。



注意: 本图仅供参考, 应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。