

α -淀粉酶 (α -AMY) 检测试剂盒 (EPS-G7 法) 说明书

(货号: ADS-W-D032 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

本法使用亚乙基阻断的对硝基苯麦芽糖苷为底物, α -淀粉酶将底物水解为乙基麦芽糖 (Et-Gx) 和对硝基苯麦芽糖 (Gy-pNP), Gy-pNP 可被 α -葡萄糖苷酶水解为葡萄糖和对硝基 (pNP) -葡萄糖糖苷。淀粉酶水解反应和 α -葡萄糖苷酶作用的最终结果是产生自由的对硝基苯酚 (p-NP)。p-Np 在 405nm 波长处有特征吸收峰, 其吸光度的变化与样本中 α -淀粉酶的活性呈正相关。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准管	粉剂 1 支	4℃避光保存	每支: 1. 临用前 8000g 4℃离 2min 使试剂落入管底; 2. 加 0.2ml 蒸馏水, 一周内用完, 配成的浓度见标签。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、天平、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本: 取约 0.1g 组织, 加入 1mL 生理盐水或 0.1mol/L 的 PBS 缓冲液 (PH 7.5), 进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 血清或肝素抗凝血浆。标本稳定性: 2℃-25℃保存可稳定 7 天, -20℃保存可稳定 1 年。不可使用溶血标本。

③ 可检测尿液样本: 在尿液中的稳定性: 20℃-25℃保存可稳定 2 天; 2℃-8℃保存可稳定 10 天; -20℃保存可稳定 3 周;

④ 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆 (可使用各类常见电动匀浆器), 12,000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清待测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min (等待仪器过自检程序亦可), 设定波长到 405nm。

② 所有试剂解冻至室温, 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μ L)	测定管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
样本	7		
蒸馏水			7
标准品		7	

试剂一	140	140	140
37℃条件下，孵育 5min。			
试剂二	50	50	50
混匀，37℃条件下，1min 时于 405nm 处读取吸光值 A1，6min 时读取 A2。ΔA = A2-A1。			

【注】：1.若 A2 值大于 1，可用生理盐水或蒸馏水对样本进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。

2.若ΔA 值小于 0.01，可增加样本加样体积 V1（如由 7μL 增至 20μL，空白管也由 7μL 增至 20μL 蒸馏水，标准管是 7μL 标准品和 13μL 蒸馏水；其他试剂均保持不变）。则改变后的 V1 代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照质量计算：

$$\alpha\text{-淀粉酶}(\alpha\text{-AMY}) (\text{U/g}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D}$$

$$= \text{标品浓度} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{W} \div 0.001 \times \text{D}$$

2、按照蛋白浓度计算：

$$\alpha\text{-淀粉酶}(\alpha\text{-AMY}) (\text{U/mg prot}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\text{Cpr} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D}$$

$$= \text{标品浓度} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr} \div 0.001 \times \text{D}$$

3、按照体积计算：

$$\alpha\text{-淀粉酶}(\alpha\text{-AMY}) (\text{U/L}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{V1} \times \text{D}$$

$$= \text{标品浓度} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times \text{D}$$

4、按细胞数量计算：

$$\alpha\text{-淀粉酶}(\alpha\text{-AMY}) (\text{U}/10^4 \text{ cell}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D}$$

$$= \text{标品浓度} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div 500 \div 0.001 \times \text{D}$$

C 标准---标品浓度，见标签；

V1---加入样本体积，0.007mL；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

精密性：重复性 CV 不大于 5%；

Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒

V---加入提取液体积，0.001L；

V2---加入标准品体积，0.007mL；

500---细菌/细胞数量，万

批间相对极差 R 不大于 5%。