

α-淀粉酶(α-AMS)检测试剂盒(DNS 比色法)

产品简介：

淀粉酶(Amylase, AMS)又称 1, 4-α-D-葡聚糖水解酶, 是水解淀粉和糖原的酶类总称, 包括α-淀粉酶、β-淀粉酶、葡萄糖淀粉酶。α-淀粉酶随机地作用于淀粉的非还原端, 生成麦芽糖、麦芽三糖、糊精等还原糖, 同时使淀粉浆的粘度下降, 因此又称为液化酶。α-淀粉酶测定方法主要分为天然淀粉底物方法和确定底物方法, 前者的方法有碘-淀粉法, 后者有以麦戊糖或 4-NP-G 为底物的方法。

Leagene α-淀粉酶(α-AMS)检测试剂盒(DNS 比色法)其检测原理是血清或血浆等样品中α-淀粉酶催化淀粉分子中的α-1,4 糖苷键水解, 产生葡萄糖、麦芽糖以及糊精等还原性糖, 麦芽糖在一定条件下和硝基水杨酸(DNS)反应生成棕红色化合物, 在 540nm 处有最大吸光度, 通过比色法检测产生的麦芽糖的量, 以此表示酶的活力, 可计算出淀粉酶的活力单位。α-淀粉酶不耐酸, 在酸性条件下被迅速钝化; β-淀粉酶不耐热, 在 70°C保温 15min 会被钝化。萌发的种子中淀粉酶含量较高, 且含有多种淀粉酶, 其他样品中亦含多种淀粉酶, 因此需要加热钝化β-淀粉酶才能测出准确的α-淀粉酶含量。用于检测植物或动物的细胞或组织裂解液或匀浆液、血浆、血清、尿液等样品中内源性的α-淀粉酶活性。其优点是灵敏、准确、精确度高, 适宜精确测量小样品的α-淀粉酶活性; 其缺点是测定步骤较繁, 不便分析大量样品, 测定范围较窄。该试剂盒仅用于科研领域, 不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

名称	编号	TE0207	Storage
试剂(A): 麦芽糖标准(2mg/ml)		100T	
试剂(B): α-AMS Assay buffer		10ml	4°C
试剂(C): DNS 显色液		50ml	4°C
使用说明书		100ml	RT 避光
			1 份

自备材料：

- 1、蒸馏水、生理盐水
- 2、水浴锅或恒温箱、离心管、离心机、容量瓶、比色杯或 96 孔板、分光光度计或酶标仪

操作步骤(仅供参考)：

- 1、稀释标准品并绘制标准曲线：按下表稀释麦芽糖标准, 分别获得 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1(mg/ml)的标准液。

加入物(ml)	0	1	2	3	4	5	6
麦芽糖标准(2mg/ml)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
蒸馏水	1.0	0.95	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
麦芽糖浓度(mg/ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
相应麦芽糖含量(mg)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1

各孔加入 1ml DNS 显色液，充分混匀，沸水浴中煮沸，取出后流水冷却，加蒸馏水定容至 10ml，以 0 号管为空白调零，分光光度计或酶标仪 540nm 处检测吸光度，以麦芽糖含量(mg)为横坐标，以标准管(1~6 号管)吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

注意：如果需要快速简易检测，则直接使用上述表格中“0”和“6”号管配合样品一起测定，根据公式计算即可。

2、准备样品：

①细胞或组织样品：取萌发的植物种子或细胞样品(组织应取 0.5g)，用适当蒸馏水进行匀浆，清洗匀浆器，混合后置于室温下提取 20min，每隔数分钟摇动一次。然后于离心 10min，收集上清液转入 50ml 容量瓶中，补水定容，即为淀粉酶液，-20℃冻存，用于 α -AMS 的检测。

②血浆、血清和尿液样品：血浆、血清按照常规方法制备，用蒸馏水 5~10 倍稀释后，可以直接用于本试剂盒的测定，尿液通常也可以直接用于测定，-20℃冻存(但为了消除样品本身颜色的干扰，可设置加了血浆或血清但不加底物的对照)。

③(选做)样品准备完毕后可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度，以便于后续计算单位蛋白重量组织或细胞内的 α -AMS 含量。

3、样品加样：按照下表设置样品对照管、样品测定管，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡。如果样品中的淀粉酶活性过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置平行管。

加入物(ml)	样品对照管	样品测定管
待测样品	0.5	0.5
70℃水浴钝化 β -淀粉酶，取出后流水冷却		
DNS 显色液(提前温浴)	1	—
40℃水浴		
α -AMS Assay buffer(提前温浴)	0.5	0.5
40℃水浴		
DNS 显色液(提前温浴)	—	1
混匀，沸水浴，取出后流水冷却，加蒸馏水定容至 10ml		

4、 α -AMS 测定：“0”号管调零，分光光度计(比色杯光径 1cm)或酶标仪测定各管 540nm

处吸光度，记为 $A_{\text{对照}}$ 和 $A_{\text{测定}}$ 。

计算：

α -淀粉酶活性单位的定义： α -淀粉酶在 40℃条件下每分钟催化水解底物产生 1mg 麦芽糖的酶量为一个酶活力单位。根据酶活性定义，计算出样品中的 α -AMS 活性。

标准曲线计算公式：以麦芽糖含量(mg)为横坐标，以标准管(1~6 号)吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，继而计算出样品的酶活力单位。

$$\text{液体样品 AMS 活力}[\text{mg}/(\text{ml}\cdot\text{min})] = (X \times N) / (V_S \times t)$$

$$\text{固体样品或组织 AMS 活力}[\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{min})] = (X \times V_T \times N) / (W \times V_S \times t)$$

式中： $X = X_{\text{测定}} - X_{\text{对照}}$ = 根据标准曲线计算待测样品所对应的麦芽糖含量(mg)

V_T = 淀粉酶提取原液总体积(ml)

N = 待测样品稀释倍数

V_S = 测定时取用的淀粉酶提取液体积(ml) = 0.5

t = 反应时间(min) = 5

W = 组织等固体样品质量(g)

快速简易公式：如果需要快速简易检测，则使用麦芽糖标准(1mg/ml)根据公式计算即可。

$$\text{液体样品 AMS 活力}[\text{mg}/(\text{ml}\cdot\text{min})] = A_{\text{测定}} \times M \times N / (A_{\text{标准}} \times V_S \times t)$$

$$\text{固体样品或组织 AMS 活力}[\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{min})] = A_{\text{测定}} \times M \times N \times V_T / (A_{\text{标准}} \times W \times V_S \times t)$$

式中： $A_{\text{测定}}$ = 待测样品的吸光度

$A_{\text{标准}}$ = 标准品的吸光度

M = 标准管麦芽糖含量(mg) = 1

V_T = 淀粉酶提取原液总体积(ml)

V_S = 测定时取用的淀粉酶提取液体积(ml) = 0.5

N = 待测样品稀释倍数

t = 反应时间(min) = 5

W = 组织等固体样品质量(g)

注意事项：

- 1、本试剂盒亦可用酶标仪进行检测，但检测的样本数相应增多。
- 2、待测样品中不能含有 AMS 抑制剂，同时需避免反复冻融。
- 3、本试剂盒亦适用于其他样品的 AMS 测定，尿液检测应先作 10~20 倍稀释后测定。在分别测定总 AMS 和 α -AMS 时，稀释倍数可能不同，需要分清楚各自的稀释倍数。
- 4、AMS Assay buffer 如果出现浑浊或絮状物，应弃用。

试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

www.leagene.com