CheKine™ α-淀粉酶活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1370　　规格: 96 T/96 S　　批号：见产品标签

≠	**检测范围：**0.0156-1 mg/mL		**灵敏度：**0.0078 mg/mL
	适用样本：唾液、动物组织、植物组织（种子或新萌发幼苗）		
	保质期：4℃，避光保存 12 个月		

注意：检测范围和灵敏度均为标准品，需要根据样本情况折算为活性的检测范围和灵敏度。

01 背景与原理

淀粉水解酶，包括α-淀粉酶（α-Amylase，α-AL）（EC 3.2.1.1）和β-淀粉酶（β-Amylase，β-AL）。α-淀粉酶随机催化淀粉中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。α-淀粉酶分布十分广泛，遍及微生物乃至高等植物。

本试剂盒检测原理是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红色物质，在 540 nm 有吸收峰；通过测定 540 nm 吸光度增加速率，计算淀粉酶活性。α-淀粉酶耐热，但是β-淀粉酶在 70℃下 15 min 可钝化。因此粗酶液经过 70℃钝化 15 min，就只有α-淀粉酶能够催化淀粉水解。

02 包装清单

试剂盒组分	规格 96 T	储存要求
DNS Reagent	40 mL	4℃，避光保存
Substrate	Powder×1 vial	4℃
Standard	Powder×1 vial	4℃

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 540 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水	试剂配制用
其他	匀浆器（组织样本）、离心机、水浴锅、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
DNS Reagent	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存；**DNS Reagent 有毒，建议在通风橱进行实验**
Working Substrate	临用前配制；加入 20 mL 去离子水，上下颠倒摇晃几次，加热至溶解	未用完的试剂 4℃保存 1 周；如有沉淀，可加热至 70℃溶解
10 mg/mL Standard	临用前配制；加入 1 mL 去离子水溶解得 10 mg/mL 标准品（葡萄糖）	未用完的试剂 4℃可保存 2 周

05-1-2 标准品配制

按下表所示，用去离子水将 10 mg/mL 标准品稀释为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0156 mg/mL 的标准溶液。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

序号	标准品体积（μL）	去离子水体积（μL）	标准品浓度（mg/mL）
1	40 μL of 10 mg/mL	360	1
2	200 μL of 1 mg/mL	200	0.5
3	200 μL of 0.5 mg/mL	200	0.25
4	200 μL of 0.25 mg/mL	200	0.125
5	200 μL of 0.125 mg/mL	200	0.0625
6	200 μL of 0.0625 mg/mL	200	0.0313
7	200 μL of 0.0313 mg/mL	200	0.0156
空白	0	400	0

05-2 样本制备

注意：对于脂肪含量较高的动物组织，离心后移除上层脂肪，再取上清液。

- **动物组织**：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL 去离子水匀浆，匀浆液倒入离心管中，在室温下放置 15 min，每隔 5 min 振荡 1 次，使其充分提取。6000 g，室温离心 10 min，吸取上清液并且加去离子水定容至 10 mL，摇匀，即为淀粉酶原液。
- **植物组织**：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL 去离子水捣碎，超声波破碎 5 min（功率 20%，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），在室温下放置 15 min，每隔 5 min 振荡 1 次，使其充分提取。6000 g，室温离心 10 min，吸取上清液并且加去离子水定容至 10 mL，摇匀，即为淀粉酶原液。
- **唾液等液体样本**：直接测定。建议预实验确定合适的稀释倍数。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 540 nm。
2. 水浴锅预热到 70℃。
3. 取 75 μL 样本沸水浴 5 min 作为对照管使用。
4. **检测体系配制**：每个样本需设置一个对照管，空白管只需做 1 管。在 EP 管中**依次**按照如下方式操作：

试剂	空白管（μL）	标准管（μL）	测定管（μL）	对照管（μL）
去离子水	75	0	0	0
Standard	0	75	0	0
样本	0	0	75	75（煮沸样本）
		70℃水浴 15 min，冷却		
Substrate	0	0	75	0
		40℃恒温水浴中保温 5 min		
DNS Reagent	150	150	150	150
Substrate	75	75	0	75

5. **吸光度检测：**混匀，沸水浴 5 min，冷却，取 200 μL 至 96 孔板中，检测 540 nm 处吸光值，分别记为 $A_{空白}$、$A_{标准}$、$A_{测定}$、$A_{对照}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] > 进入“**技术中心**”> 查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$

2. 标准曲线绘制

以标准液浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线。将$\Delta A_{测定}$带入方程得到 y 值（mg/mL）。

3. 样本α-淀粉酶活性计算

- 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

α-淀粉酶活性(U/mg prot)=$y\times V_{样}\div(Cpr\times V_{样})\div T$**=0.2×y÷Cpr**

- 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟催化产生 1 mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

α-淀粉酶活性(U/g)=$y\times V_{样}\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\div T$**=2×y÷W**

- 按样本体积计算

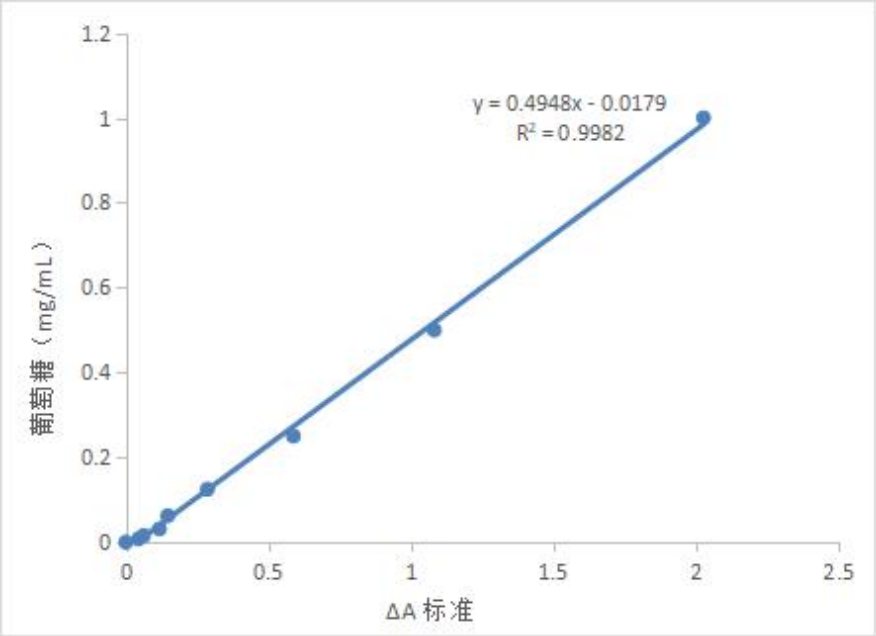
单位的定义：每升液体样本每分钟产生 1 mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

α-淀粉酶活性(U/L)=1000×y÷T**=200×y**

$V_{样}$：加入反应体系中样本体积，0.075 mL；W：样本质量，g；$V_{样总}$：样本总体积，10 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；1000: 1 L=1000 mL。

07 结果展示

典型标准曲线：y=0.4948x-0.0179，R^2=0.9982



示例-1：取 0.1 g 小鼠肝，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$=1.696-0.614=1.082，代入标准曲线，计算 y=0.517。按样本鲜重计算得：α-淀粉酶活性(U/g)=2×y÷W=10.34 U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本$\Delta A_{测定}$过高或者过低怎么办?**

如果样本$\Delta A_{测定}$大于 1 mg/mL 标准品的$\Delta A_{标准}$值，则说明样本酶活力太高，必须用去离子水稀释成适当浓度，再重新进行测定。若$\Delta A_{测定}$小于 0.005，可以重新提取样本减少去离子水定容的体积。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1300	CheKine™ 葡萄糖检测试剂盒（微量法）
KTB1310	CheKine™ 葡萄糖氧化酶活性（GOD）检测试剂盒（微量法）
KTB1320	CheKine™ 植物可溶性糖含量检测试剂盒（微量法）
KTB1330	CheKine™ 血糖含量检测试剂盒（微量法）
KTB1340	CheKine™ 糖原含量检测试剂盒（微量法）
KTB1350	CheKine™ 总糖含量检测试剂盒（微量法）
KTB1360	CheKine™ 还原糖含量检测试剂盒（微量法）

CheKine™ α-淀粉酶活性检测流程示意图

（Abbkine 货号 ： KTB1370）

