β-淀粉酶(β-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。β-淀粉酶每次从淀粉的非还原端切下一个分子的麦芽糖，因此又被称为糖化酶。

β-淀粉酶(β-AMS)检测试剂盒(DNS 比色法)其检测原理是α-淀粉酶和β-淀粉酶从淀粉上分解出来的麦芽糖能还原硝基水杨酸形成棕红色化合物，在 540nm 处有最大吸光度，通过比色法分别检测α-淀粉酶和(α+β)-淀粉酶分解淀粉产生的麦芽糖的量，以此表示酶的活力，通过差值可计算出β-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℃保温 15min 会被钝化。本法采用先加热钝化β-淀粉酶，测出α-淀粉酶的活力，再与非钝化条件下测定的（α+β)-淀粉酶总活力比较，即可求出β-淀粉酶活力。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淀粉酶活性。该试剂盒优点是灵敏、准确、精确度高，适宜精确测量小样品β-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:

编号 / 名称	GCTE0209 100T	Storage
试剂(A): 麦芽糖标准(2mg/ml)	10ml	4℃
试剂(B): β-AMS Assay buffer	50ml	4℃
试剂(C): DNS 显色液	100ml	RT 避光
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、 待测样品：血清、植物组织等

2、 蒸馏水或生理盐水

3、 水浴锅或恒温箱、比色杯或 96 孔板、分光光度计或酶标仪、离心管、离心机、容量瓶

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 10min，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 8000r/min 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，用于α-AMS 和(α+β) -AMS 活性的检测。

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 AMS 含量。

3、AMS 加样：按照下表设置Ⅰ-1、Ⅰ-2、Ⅱ-1、Ⅱ-2，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加蒸馏水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)	Ⅰ-1	Ⅰ-2	Ⅱ-1	Ⅱ-2
淀粉酶液	0.5	0.5	—	—
70℃水浴 15min 钝化β-淀粉酶，取出后流水冷却。				
淀粉酶液	—	—	0.5	0.5
DNS 显色液(提前温浴)	1	—	1	—
混匀，40℃水浴保温 10min。				
AMS Assay buffer(提前温浴)	0.5	0.5	0.5	0.5
混匀，40℃水浴保温 5min。				
DNS 显色液(提前温浴)	—	1	—	1
混匀，沸水浴 10min，取出后流水冷却，加蒸馏水定容至 10ml。				

4、AMS 测定：以标准测定中的“0”号管调零，分光光度计(比色杯光径 1cm)或酶标仪测定 540nm 处Ⅰ-1、Ⅰ-2、Ⅱ-1、Ⅱ-2 的吸光度，分别记为 $A_{Ⅰ-1}$、$A_{Ⅰ-2}$、$A_{Ⅱ-1}$、$A_{Ⅱ-2}$。其中，$A_{Ⅰ-1}$为α-AMS 样品对照管，$A_{Ⅰ-2}$为α-AMS 样品测定管；$A_{Ⅱ-1}$为总 AMS 样品对照管，$A_{Ⅱ-2}$为总 AMS 样品测定管。

计算：

淀粉酶活性单位的定义：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，分别计算出样品中α-AMS 和(α+β) -AMS（即总 AMS）的活性，以(α+β) -AMS 活力减去α-AMS 活力即得 β-AMS 活力。

淀粉酶活力计算：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。根据各管吸光度值，在标准曲线上查出对应的麦芽糖含量(mg)，再按下列公式分别计算α-AMS 和总 AMS 的活力单位，然后计算出β-AMS 的活力单位。

液体样品

总 AMS 活力[mg/(ml·min)]=$(X_{Ⅱ-2}-X_{Ⅱ-1})\times N/(V_{Ⅱ}\times t)$

α-AMS 活力[mg/(ml·min)]=$(X_{Ⅰ-2}-X_{Ⅰ-1})\times N/(V_{Ⅰ}\times t)$

β-AMS 活力[mg/(ml·min)]=总 AMS 活力-α-AMS 活力

固体样品或组织

总 AMS 活力[mg/(g·min)]=$(X_{Ⅱ-2}-X_{Ⅱ-1})\times V_T\times N/(W\times V_{Ⅱ}\times t)$

α-AMS 活力[mg/(g·min)]=$(X_{Ⅰ-2}-X_{Ⅰ-1})\times V_T\times N/(W\times V_{Ⅰ}\times t)$

β-AMS 活力[mg/(g·min)]=总 AMS 活力-α-AMS 活力

快速简易公式：如果需要快速简易检测，则用麦芽糖含量(1mg)做参比，根据公式计算即可。

液体样品

总 AMS 活力[mg/(ml·min)]=$(A_{Ⅱ-2}-A_{Ⅱ-1})\times M\times N/(A_{标准}\times V_{Ⅱ}\times t)$

α-AMS 活力[mg/(ml·min)]=$(A_{Ⅰ-2}-A_{Ⅰ-1})\times M\times N/(A_{标准}\times V_{Ⅰ}\times t)$

β-AMS 活力[mg/(ml·min)]=总 AMS 活力-α-AMS 活力

固体样品或组织

总 AMS 活力[mg/(g·min)]=$(A_{Ⅱ-2}-A_{Ⅱ-1})\times M\times N\times V_T/(A_{标准}\times W\times V_{Ⅱ}\times t)$

α-AMS 活力[mg/(g·min)]=$(A_{Ⅰ-2}-A_{Ⅰ-1})\times M\times N\times V_T/(A_{标准}\times W\times V_{Ⅰ}\times t)$

β-AMS 活力[mg/(g·min)]=总 AMS 活力-α-AMS 活力

式中：X=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

$V_{Ⅰ}$=测定α-淀粉酶时取用的提取液体积(ml)=0.5

$V_{Ⅱ}$=测定总淀粉酶时取用的提取液体积(ml)=0.5

t=反应时间(min)=5

W=组织等固体样品质量(g)

$A_{标准}$=麦芽糖含量为 1mg 的标准品的吸光度

M=标准管麦芽糖含量(mg)=1

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、酶活性在 400U 以下时与底物的水解量呈线性关系，如测定管的吸光度比空白管的吸光度小 1 倍时，应加大样品稀释倍数或减少加入待测样品的量，重新测定，测定结果应乘以稀释倍数。

4、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。

5、AMS Assay buffer 如果出现浑浊或絮状物，应弃用。

6、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

7、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期: 6 个月有效。低温运输，按要求保存。

相关产品:

产品编号	产品名称
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCPW0053	Western 抗体洗脱液(碱性)
GCTC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法)
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)

