（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!）

产品货号：E-BC-K007-M

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(535-540 nm)

Elabscience®α-淀粉酶比色法测试盒

α-Amylase Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清、唾液、植物、动物组织样本中的α-淀粉酶活力。

检测原理

还原糖与 3，5-二硝基水杨酸在加热条件下反应，生成棕红色物质，利用β-淀粉酶不耐热的特性，将其钝化，然后测定α-淀粉酶的酶活。

本试剂盒检测组织样本时，需要测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	底物 (Substrate)	10 mL×1 瓶	2-8°C 保存 12 个月
试剂二 (Reagent 2)	显色剂 (Chromogenic Agent)	20 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 12 个月
试剂三 (Reagent 3)	10 mg/mL 标准品 (10 mg/mL Standard)	1.5 mL×1 支	2-8°C 保存 12 个月
	96 孔酶标板	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，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。

所需自备物品

仪器：酶标仪(535-540 nm，最佳检测波长 540 nm)，恒温水浴锅(95°C)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂一、二、三平衡至室温。

② 样本检测前，试剂一、二40°C预热10 min，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 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mg/mL)	**0**	**0.2**	**0.4**	**0.6**	**0.8**	**1.0**	**1.2**	**1.4**
10 mg/mL 标准品(μL)	0	20	40	60	80	100	120	140
双蒸水(μL)	1000	980	960	940	920	900	880	860

样本准备

① 样本处理

血清、唾液等液体样本：直接检测。

组织样本：称取 0.1 g 组织样本，加入 0.9 mL 双蒸水，研磨匀浆(也可机械匀浆)，收集匀浆液至离心管中，匀浆液在室温下放置提取 15 min，每 5 min 振荡一次(10 s)，使其充分提取，提取完成后，室温条件下，3000 × g，离心 10 min，取上清加双蒸水定容至 10 mL，混匀，待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.0097-0.3474 U/mL，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
1%青椒	不稀释	1%玉米粒	不稀释
1%绿萝	不稀释	1%胡萝卜	不稀释

注：稀释液为双蒸水。

实验关键点

① 试剂一中若有沉淀析出，需 70-80°C 加热溶解后，冷却至 40°C待用。

② 试剂二中若有黄色固体析出，需 70-80°C 加热溶解后，冷却至 40°C 待用。

③ 显色完成后，若有沉淀，可室温条件下 4000 × g 离心 5 min，取上清测定。

④ 当绝对 OD 值大于 0.747 时，需要适当稀释。

操作步骤

标准曲线部分

① 取 16 个 1.5 mL 的 EP 管，并编号 A-H，每个编号两管，分别取 75 μL 不同浓度标准品，加入到对应的标准管中。

② 向①中各标准管加入 75 μL 试剂一。

③ 向②中各标准管加入 150 μL 试剂二。

④ 混匀 3 s，95°C 水浴 5 min，流水冷却后，取 250 μL 到酶标板中，酶标仪 540 nm 处，测定各孔 OD 值。

样本部分

① 对照管、测定管：取 75 μL 待测样本加入到对照管、测定管中。

② 70°C 水浴 15 min，流水冷却。

③ 对照管：向②中对照管加入 75 μL 双蒸水。
测定管：向②中测定管加入 75 μL 试剂一。

④ 40°C 反应 5 min。

⑤ 向④中各管加入 150 μL 试剂二。

⑥ 混匀 3 s，95°C 水浴 5 min，流水冷却后，取 250 μL 到酶标板中，酶标仪 540 nm 处，测定各孔 OD 值。

操作表

标曲操作表

	标准管
不同浓度标准品(μL)	75
试剂一(μL)	75
试剂二(μL)	150
混匀 3 s, 95°C 水浴 5 min, 流水冷却后, 取 250 μL 到酶标板中, 酶标仪 540 nm 处, 测定各孔 OD 值。	

样本操作表

	对照管	测定管
待测样本(μL)	75	75
70°C 水浴 15 min，流水冷却		
双蒸水(μL)	75	--
试剂一(μL)	--	75
40°C 准确反应 5 min		
试剂二(μL)	150	150
混匀 3 s 后，95°C 水浴 5 min，流水冷却后，取 250 μL 到酶标板中，酶标仪 540 nm 处，测各孔 OD 值。		

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

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 1 mg 还原糖为 1 个酶活单位。

$$\underset{(U/mL)}{\alpha\text{-淀粉酶活力}} = (\Delta A - b) \div a \times V_3 \div t \div V_2 \times f$$

组织样本的结果计算：

定义：每克组织每分钟催化产生 1 mg 还原糖为 1 个酶活单位。

$$\underset{(U/g\ 组织)}{\alpha\text{-淀粉酶活力}} = (\Delta A - b) \div a \times V_3 \div t \div w \times \frac{V_1}{V_2} \times f$$

或者定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 mg 还原糖为 1 个酶活单位

$$\underset{(U/mgprot)}{\alpha\text{-淀粉酶活力}} = (\Delta A - b) \div a \times V_3 \div t \div V_2 \times f \div C_{pr}$$

注解：

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：OD 值对应的浓度

a：标准曲线斜率

b：标准曲线截距

ΔA：样本测定 OD 值-对照 OD 值

V_3：酶促反应体积(0.15 mL)

V_2：加入反应体系中的样本体积(0.075 mL)

V_1：组织样本制备的体积(10 mL)

t：酶促反应时间(5 min)

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

w：样本制备时所需的样本质量(0.1 g)

C_{pr}：样本加入检测体系前的蛋白浓度(mgprot/mL)

附录1 关键数据

1. 技术参数

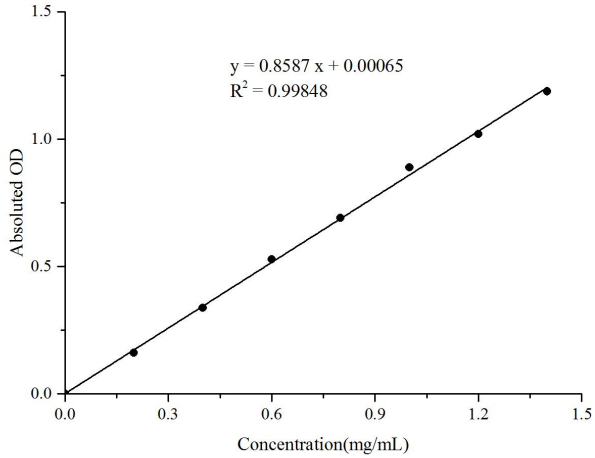
检测范围	0.0097-0.3474 U/mL	**平均批间差**	3.9 %
灵敏度	0.0097 U/mL	**平均批内差**	3 %
平均回收率	98 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①标准品浓度测定数据：

标准品浓度 (mg/mL)	**0**	**0.2**	**0.4**	**0.6**	**0.8**	**1.0**	**1.2**	**1.4**
OD 值	0.139	0.310	0.465	0.668	0.839	1.018	1.142	1.339
	0.140	0.292	0.489	0.669	0.821	1.040	1.176	1.317
平均 OD 值	0.140	0.301	0.477	0.668	0.830	1.029	1.159	1.328
绝对 OD 值	0.000	0.161	0.338	0.529	0.690	0.889	1.019	1.188

②绘制标曲(如下图)：



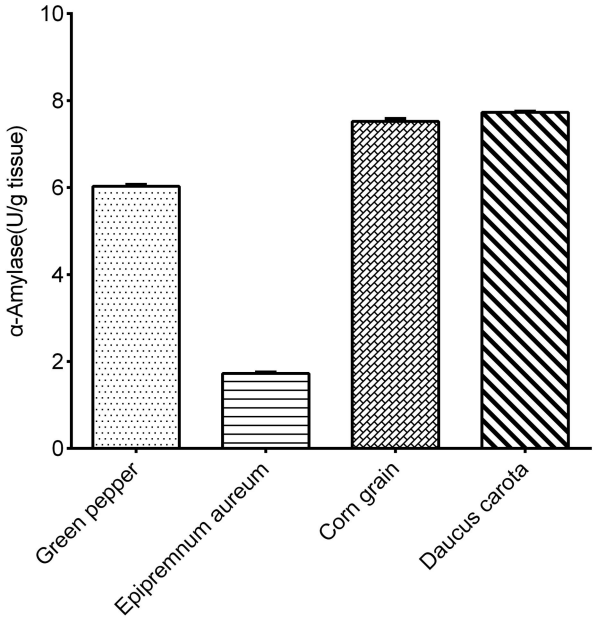
附录2 实例分析

例如检测青椒(数据仅供参考)：

取0.1g青椒，按样本处理部分制备，之后按照说明书操作，结果如下：标准曲线：y = 0.8729 x - 0.0112，测定孔平均OD值为0.368，对照孔平均OD值为0.247，计算结果为：

$$\text{α-淀粉酶活力 (U/g 组织)} = (0.368 - 0.247 + 0.0112) \div 0.8729 \times 0.15 \div 5 \div 0.1 \times 10 \div 0.075 = 6.06 \text{ U/g 组织}$$

按照说明书操作，测定1%青椒(加样量75 μL)、1%绿萝(加样量75 μL)、1%玉米粒(加样量75 μL)和1%胡萝卜(加样量75 μL)中α-淀粉酶活力含量(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
绝对 OD 值低	OD 值太高	按照标准品稀释表重新稀释标准品
	样本值低	按照计算公式进行计算
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
样本测量结果>0.56 U/mL	样本浓度太高	选择合适稀释倍数，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。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。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Yuni Hong, Yun-Hyeok Choi, Young-Eun Han, et al. Central Administration of Ampelopsin A Isolated from Vitis vinifera Ameliorates Cognitive and Memory Function in a Scopolamine-Induced Dementia Model[J]. Antioxidants-Basel. 2021 Jun; 10(6):835. IF:6.312
2. Li Q, R Cebrián, M Montalbán-López, et al. Outer-membrane-acting peptides and lipid II-targeting antibiotics cooperatively kill Gram-negative pathogens[J]. Communications Biology, 2021, 4(1). IF:6.268
3. Naseh A, Shirin B, Maryam M,et al.Attenuation of chronic arsenic neurotoxicity via melatonin in male offspring of maternal rats exposed to arsenic during conception: Involvement of oxidative DNA damage and inflammatory signaling cascades[J]. Life Sciences 266 (2021) 118876. IF:5.037
4. Baek S Y, Li F Y, Kim D H, et al. Enteromorpha prolifera extract improves memory in scopolamine-treated mice via downregulating amyloid-β expression and upregulating BDNF/TrkB pathway[J]. Antioxidants, 2020, 9(7): 620. IF:5.014
5. Aydinoglu F, Ad?belli E?, Y?lmaz-Oral D, Ogulener N. Involvement of RhoA/Rho-kinase in l-cysteine/H2S pathway-induced inhibition of agonist-mediated corpus cavernosal smooth muscle contraction. Nitric Oxide. 2019;85:54 鈥?60. IF:3.371
6. Cui Y, Wang Y, Liu G. Protective Effect of Barbaloin in a Rat Model of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Through the Regulation of the CNPY2?PERK Pathway[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2019. IF:2.928
7. Altaf S, Muhammad F, Aslam B, et al. Cell membrane enveloped polymeric nanosponge for detoxification of chlorpyrifos poison: In vitro and in vivo studies[J]. Human & Experimental Toxicology, 2021, 40(8):1286-1295. IF:2.903
8. Song Q Q, NIN J P, Zhang S Y, et al. Effects of Simulated Heat Wave and Ozone on High Fat Diet ApoE Deficient Mice[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2018, 31(10): 757-768. IF:2.518
9. Wang L, Yang Y, Cui Q, et al. Evaluating the added predictive ability of MMP-9 in serum for Kawasaki disease with coronary artery lesions[J]. Journal of Investigative Medicine, 2020. IF:2.304

10. Yilmaz-Oral D, Kaya-Sezginer E, Oztekin C V, et al. Evaluation of combined therapeutic effects of hydrogen sulfide donor sodium hydrogen sulfide and phosphodiesterase type-5 inhibitor tadalafil on erectile dysfunction in a partially bladder outlet obstructed rat model[J]. Neurourology and Urodynamics, 2020, 39(4): 1087-1097. IF:2.037
11. Yilmaz E, Kaya-Sezginer E, Yilmaz-Oral D, et al. Effects of Hydrogen Sulphide Donor, Sodium Hydrosulphide Treatment on the Erectile Dysfunction in L-NAME-induced Hypertensive Rats[J]. Andrologia, 2019. IF:1.84
12. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. J Adv Res. 2022.