淀粉酶（AMS）测试盒说明书

（货号：C016-1-2　淀粉－碘比色法　微板法　96T）

免责声明：测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理：

淀粉酶能水解淀粉生成葡萄糖、麦牙糖及糊精，在底物浓度已知并且过量的情况下，加入碘液与未水解的淀粉结合生成蓝色复合物，根据蓝色的深浅可推算出水解的淀粉量，从而计算出 AMS 的活力。

二、试剂盒组成与试剂配制：(试剂盒有效期 6 个月)

试剂一：0.4mg/mL 底物缓冲液，5mL×1 支，4℃冰箱保存。

试剂二：碘贮备液，0.5mL×1 支，4℃避光保存。用时按碘贮备液:蒸馏水=1∶69 的比例混合配成**碘应用液**，用多少配多少，现用现配，避光放置。

三、所需仪器及试剂：

可调 660nm 波长的酶标仪及 96 孔板（附送一块），37℃水浴锅或恒温箱，蒸馏水，生理盐水，蛋白测定试剂（组织样本用，本公司有售）。

四、操作步骤：

1、样本前处理：

血清(浆)等液体样本：直接使用。

细胞培养液：吸取部分 2000 转/分离心 5 分钟,取上清待测。

动物组织样本：准确称取组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的生理盐水,冰水浴条件下匀浆,4000 转/分,离心 10 分钟,取上清液待测（上清液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售）。

细胞样本：收集细胞后，每份细胞（细胞数量尽量不要低于 10^6 个，越多越好）加入 0.3mL 的生理盐水，冰水浴条件下超声破碎（功率 200-300W，运行 5 秒，间隔 15 秒，反复 3-5 次），4000 转/分，离心 10 分钟，取上清液待测（上清液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售）。

2、操作表：（试剂一提前 5 分钟 37℃预温）

	测定孔	空白孔	水对照孔
待测样本（μL）	5		
试剂一（μL）	25	25	
蒸馏水（μL）		5	205
轻轻震荡孔板混匀，37℃准确反应 7.5 分钟			
碘应用液（μL）	175	175	
轻轻震荡孔板混匀，660nm 波长，酶标仪测各孔吸光值 A			

[注]：每批实验空白孔与水对照孔只需做 1-2 孔；不同样本批量测试前需要做预实验，确定最佳取样浓度，将（A 空白-A 测定）控制在 0.028～0.084 之间；水对照孔可以单独做。

五、计算：

1、血清（浆）等液体样本计算：

①、单位定义：每 dL（100mL）血清（浆），在 37℃与底物作用 30 分钟,水解 10mg 淀粉为 1 个单位 U。

②、计算公式：

$$\text{AMS活力}(\text{U/dl}) = \frac{A_{空白} - A_{测定}}{A_{空白} - A_{水对照}} \times \frac{C_{底物液} \times V_{底物液}}{10} \times \frac{30}{T} \times \frac{100}{V_{样}} \times N$$

2、组织或细胞样本按蛋白浓度计算：

①、单位定义：样本中每毫克蛋白对应的酶在 37℃与底物作用 30 分钟，水解 10mg 淀粉定义为 1 个淀粉酶活力单位。

②、计算公式：

$$\text{AMS活力}(\text{U/mg蛋白}) = \frac{A_{空白} - A_{测定}}{A_{空白} - A_{水对照}} \times \frac{C_{底物液} \times V_{底物液}}{10} \times \frac{30}{T} \times N \div (V_{样} \times Cpr)$$

3、组织样本按样本质量计算：

①、单位定义：每克组织含有的酶在 37℃与底物作用 30 分钟，水解 10mg 淀粉定义为 1 个淀粉酶活力单位。

②、计算公式：

$$\text{AMS活力}(\text{U/g组织}) = \frac{A_{空白} - A_{测定}}{A_{空白} - A_{水对照}} \times \frac{C_{底物液} \times V_{底物液}}{10} \times \frac{30}{T} \times N \div (V_{样} \times \frac{W}{V_{样总}})$$

以上公式中：

$C_{底物液}$为试剂一浓度,0.4mg/mL;

$V_{底物液}$为反应时加入的试剂一的量，0.025mL；

T 为反应时间，7.5min；

$V_{样}$为反应时加入的样本量，0.005mL；

N 为样本测试前稀释倍数；

Cpr 为匀浆液蛋白浓度，mg/mL；

W 为组织重量，g；

$V_{样总}$为组织匀浆时匀浆液的总体积，mL。

七、注意点：

1、样本测试前必须进行预试，以测定绝对 OD 值（空白 OD 值-测定 OD 值）在 0.028-0.084 内为宜；

2、此法可直接在 96 孔板中加样操作，操作时样本数量最好不要太多以免加样或加试剂时间太长影响结果，如样本过多可分批检测或采用多道加样枪操作以减少样本间的反应时间误差；

3、加样本和试剂时，不要产生气泡，以免对结果造成影响；

4、波长选择 660nm，如果没有可在 650nm-670nm 范围内选取，否则影响较大；

5、在做组织样本（特别是肠道样本）时，预试时匀浆液稀释倍数尽量大些（一般可以考虑从 50 或 100 倍开始稀释），稀释浓度点尽量多（一般可以选 5-7 个浓度），其稀释倍数可能较大（有的可能会上千倍稀释）；

6、因有些样本预试较难做，所给试剂均为过量（多余试剂方便客户做预试时使用）；

7、若是测定孔较空白孔颜色明显偏浅，但是测得吸光值却大，则可能是样本浑浊或不透明使得吸光值较高，此时可以做个样本对照孔（5μL 样本+200μL 蒸馏水，混匀后直接 660nm 处读数），计算 A 空白-A 测定是否在 0.028~0.084 范围内时，将 A 测定用（A 测定-A 对照+A 水对照）代替。

附录：大鼠血清淀粉酶浓度反应曲线

1、前处理：

取大鼠血清用生理盐水稀释不同倍数：2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍、64 倍、128 倍、256 倍，各取样 5μL 测定。

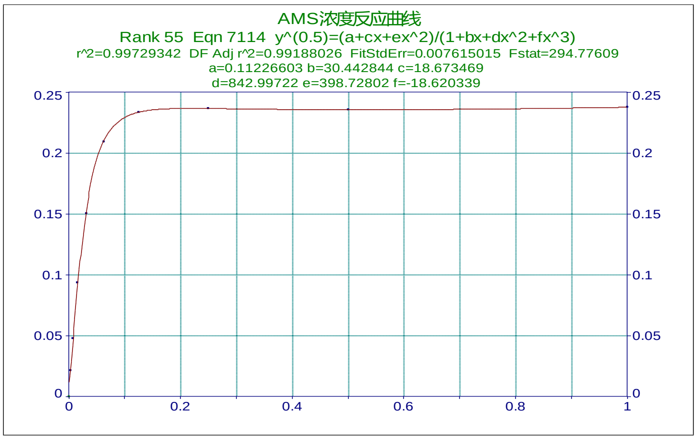
2、操作表：（试剂一提前 5 分钟 37℃预温）

	测定孔	空白孔	水对照孔
底物缓冲液（μL）	25	25	
待测样本（μL）	5		
蒸馏水（μL）		5	205
轻轻震荡孔板，37℃水浴，准确反应 7.5 分钟			
碘应用液（μL）	175	175	
轻轻震荡孔板，660nm 波长，酶标仪测各孔吸光度 A			

3、测定结果：

样本浓度（%）	测定 OD 值	绝对 OD 值
水对照孔	0.034	
空白孔	0.242	0
1	0.039	0.203
0.5	0.040	0.202
0.25	0.041	0.201
0.125	0.044	0.198
0.0625	0.063	0.179
0.03125	0.114	0.128
0.015625	0.162	0.080
0.007813	0.202	0.040
0.003906	0.224	0.018

4、绘图如下：



（从上图可以看出：绝对 OD 值在 0~0.08 间反应曲线近似直线状，所以该绝对 OD 值区间对应的样本浓度即为最佳取样浓度）

（以上曲线供用户作预试参考用）