



α-淀粉酶 (AMS) 测试盒说明书

(货号: C016-1-1 淀粉-碘比色法 100管/96样)

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:

α-淀粉酶能水解淀粉生成葡萄糖、麦芽糖及糊精, 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、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 0.4mg/mL 底物缓冲液, 60mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 0.1mol/L 碘贮备液, 7mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

碘应用液的配制: 按碘贮备液: 蒸馏水=1:9 稀释, 现用现配, 4℃ 避光保存。

三、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿, 涡旋混匀器, 37℃ 水浴锅, 蒸馏水, 生理盐水, 蛋白测定试剂 (组织或细胞样本用, 本公司有售)。

四、操作步骤:

1、样本前处理:

血清(浆)或消化液: 直接使用。

动物组织: 称重, 按重量体积比 1(g):9(mL) 的比例加入生理盐水, 机械匀浆, 4000 转/分钟, 离心 10 分钟, 取上清 (即 10% 匀浆上清) 待测 (匀浆上清需测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)。

植物组织: 取植物组织, 用清水清洗表面污渍, 吸干表面水渍, 剪碎, 放入研钵中, 加入液氮, 快速研磨成粉状, 再转移至可以密封的容器 (如离心管、自封袋等) 中; 取该植物粉末称重, 按重量体积比 1(g):4(mL) 的比例加入 磷酸盐缓冲液 (0.01M, PH7.0-7.4) 放入研磨仪中研磨 (50hz, 30 秒/次, 运行 2-3 次), 取出 4000 转/分钟, 离心 10 分钟, 取上清待测。

培养细胞: 将制备好的细胞悬液取出, 1000 转/分钟, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀; 用等渗缓冲液 (推荐 0.01mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液) 清洗 1~2 次, 同样 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀; 加入 0.2~0.3mL 的匀浆介质 (推荐 0.01mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水) 进行匀浆, 冰水浴条件下超声破碎或手动匀浆, 制备好的匀浆液 4000 转/分钟, 离心 10 分钟, 取上清待测。

注: 每次新样本测定时, 必须先做预实验!

2、操作表: (样本测试前需挑选至少 2 例做预实验, 分别稀释不同倍数 (如血清样本用生理盐水稀释 10 倍、20 倍、50 倍、100 倍等, 肠道内容物样本稀释倍数更大), 选择 ΔA 在 0.05~0.15 之间对应的稀释倍数做正式实验)

	测定管	空白管
试剂一 (mL) 37℃ 预温 5 分钟	0.5	0.5
待测样本 (mL)	0.1	
混匀, 37℃ 水浴准确反应 7.5 分钟		
碘应用液 (mL)	0.5	0.5
蒸馏水 (mL)	3.0	3.1
混匀, 660nm 波长, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 分光光度计测各管吸光度 (A), 计算 ΔA=A _{空白} -A _{测定} 。		

[注]: 每批操作空白管至少做 1 管; 为控制反应时间, 每批实验样本数量不宜太多, 建议每批测定管数量不大于 15 个, 且每批数量尽量相近; ΔA 不在 0.05~0.15 之间的样本, 可改变稀释倍数后重新再测。

五、单位定义与计算:

1、血清(浆)等液体样本计算:

①、单位定义: 100mL 液体样本中的 AMS, 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:

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

2、组织或细胞样本计算:

①、单位定义: 样本中每毫克蛋白对应的 AMS 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(U)。

②、计算公式:

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

以上公式中:

C_{底物液}: 底物液浓度, 0.4mg/mL;

V_{底物液}: 底物液加入量, 0.5mL;

T: 反应时间, 7.5min;

V_样: 取样量, 0.1mL;

N: 样本测试前稀释倍数;

Cpr: 组织匀浆蛋白浓度, mg/mL。

六、注意事项:

1、按操作表做完后, 空白管应为蓝棕色 (偏棕色), 测定管颜色稍浅; 需注意测定管若为黄色 (或吸光值过低), 则该样本浓度偏高, 需加大样本稀释倍数后再测, 否则计算结果偏低。

2、不同样本 α-淀粉酶活力差异很大, 食糜样本差异最大 (从几十倍到几千倍稀释不等), 需要注意: 大、小鼠血清需要稀释 50-100 倍后测定。

附录 I：大鼠血清 α -淀粉酶浓度曲线

1、前处理：

取大鼠血清用生理盐水稀释成不同浓度：2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍、64 倍、128 倍、256 倍，取样 0.1mL 待测。

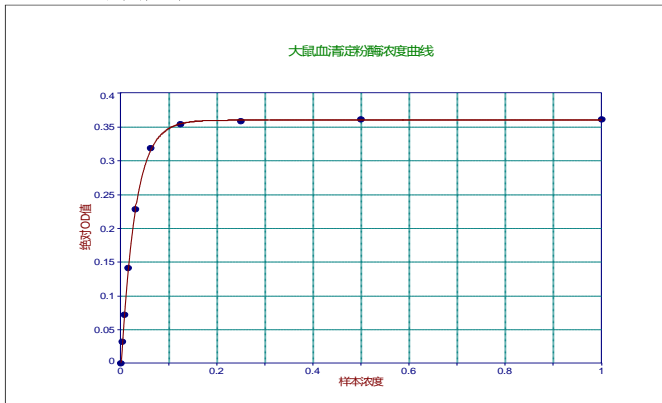
2、操作表：

	测定管	空白管
试剂一（mL）37℃预温 5 分钟	0.5	0.5
不同稀释倍数的血清样本（mL）	0.1	
混匀，37℃水浴准确反应 7.5 分钟		
碘应用液（mL）	0.5	0.5
蒸馏水（mL）	3.0	3.1
混匀，660nm 波长，1cm 光径，蒸馏水调零，测各管吸光度（A），计算 $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。		

3、测定结果：

样本浓度	测定 OD 值	绝对 OD 值
空白	0.369	
1	0.008	0.361
0.5	0.008	0.361
0.25	0.010	0.359
0.125	0.015	0.354
0.0625	0.050	0.319
0.03125	0.140	0.229
0.015625	0.227	0.142
0.007813	0.297	0.072
0.003906	0.336	0.033

4、绘图如下：



综上所述,选择的最佳样本浓度为 0.07813(128 倍稀释)。

附录 II：大鼠胰腺组织 α -淀粉酶浓度曲线

1、前处理：

称取胰腺组织，制备成 10% 匀浆液，再用生理盐水稀释成不同的倍数：2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍、64 倍、128 倍，取样 0.1mL 待测

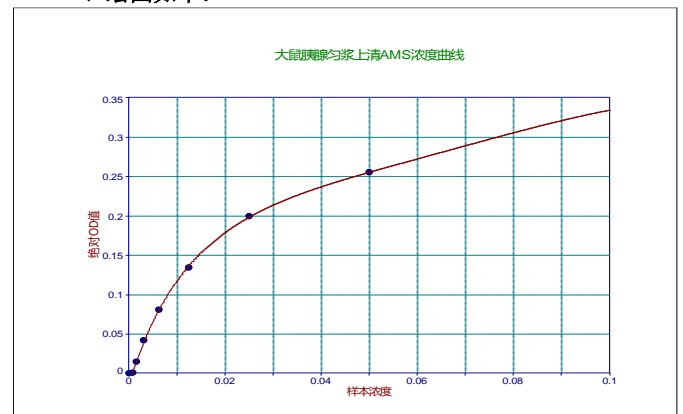
2、操作表：

	测定管	空白管
试剂一（mL）37℃预温 5 分钟	0.5	0.5
不同稀释倍数的匀浆（mL）	0.1	
混匀，37℃水浴准确反应 7.5 分钟		
碘应用液（mL）	0.5	0.5
蒸馏水（mL）	3.0	3.1
混匀，660nm 波长，1cm 光径，蒸馏水调零，测各管吸光度（A），计算 $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。		

3、测定结果：

样本浓度	测定 OD 值	绝对 OD 值
空白	0.368	
10.000%	0.034	0.335
5.000%	0.113	0.256
2.500%	0.168	0.200
1.250%	0.234	0.135
0.625%	0.287	0.081
0.313%	0.326	0.042
0.156%	0.353	0.015
0.078%	0.367	0.001

4、绘图如下：



综上所述,选择的最佳样本浓度为 0.625%。