

# $\alpha$ -淀粉酶 (AMS) 测试盒

(货号: BC041 淀粉-碘比色法 100管/96样)

## 一、测定原理:

$\alpha$ -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°C 保存。

**试剂二:** 0.1mol/L 碘贮备液, 7mL×1 瓶, 4°C 避光保存。

**碘应用液的配制:** 按碘贮备液: 双蒸水=1:9 稀释, 现用现配, 4°C 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°C 水浴锅, 双蒸水 (或蒸馏水), 生理盐水, 蛋白测定试剂 (组织或细胞样本用, 本公司有售 BC016)。

## 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,3500 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 BC016)。

**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 (0.1M, PH7.0-7.4) 放入研磨仪中研磨 (50hz,30 秒/次,运行 2-3 次),取出 3500 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 0.1mol/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 0.1mol/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 3500 转/分钟离心 10 分钟,取上清待测。

**注:** 不同样本测试时稀释倍数不同,从几十倍至几百上千倍均有,尤其消化道中含量较高。

### 2、操作表:

	测定管	空白管
试剂一 (mL) 37°C 预温 5 分钟	0.5	0.5
待测样本 (mL)	0.1	
混匀, 37°C 水浴, 准确反应 7.5 分钟		
碘应用液 (mL)	0.5	0.5
双蒸水 (mL)	3.0	3.1
混匀, 660nm 波长, 1cm 光径, 双蒸水调零, 分光光度计测各管吸光度 A。		



[注]: 样本批量测试前需要做预实验, 确定最佳取样浓度, 将(空白 OD - 测定 OD) 控制在 0.05 ~ 0.15 之间。

## 五、计算与举例:

### 1、血清(浆)计算与举例

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

#### ②、计算公式:

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

$C_{\text{底物液}}$ : 底物液浓度, 0.4mg/mL;

$V_{\text{底物液}}$ : 底物液加入量, 0.5mL;

$T$ : 反应时间, 7.5min;

$V_{\text{样}}$ : 取样量, 0.1mL;

$N$ : 样本测试前稀释倍数。

#### ③、计算举例:

取某人血清用生理盐水 10 倍稀释后取样 0.1mL 作 AMS 测定, 测定管 OD 为 0.308, 空白管 OD 为 0.383, 则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{AMS活力 (U/dl)} &= \frac{0.383 - 0.308}{0.383} \times \frac{0.4 \times 0.5}{10} \times \frac{30}{7.5} \times \frac{100}{0.1} \times 10 \\ &= 156.658 \text{U/dl} \end{aligned}$$

### 2、组织或细胞中计算与举例:

①、单位定义: 组织中每毫克蛋白在 37°C 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:

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

$C_{\text{底物液}}$ : 底物液浓度, 0.4mg/mL;

$V_{\text{底物液}}$ : 底物液加入量, 0.5mL;

$T$ : 反应时间, 7.5min;

$V_{\text{样}}$ : 取样量, 0.1mL;

$\text{Cpr}$ : 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

#### ③、计算举例:

**例 1:** 取 1% 大鼠肺匀浆 0.1mL 作 AMS 测定, 测定管 OD 为 0.275, 空白管 OD 为 0.383, 1% 大鼠肺匀浆的蛋白浓度为 0.5677 mgprot/mL, 则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{AMS活力 U/mgprot} &= \frac{0.383 - 0.275}{0.383} \times \frac{0.4 \times 0.5}{10} \times \frac{30}{7.5} \div (0.1 \times 0.5677) \\ &= 0.3973 \text{U/mgprot} \end{aligned}$$

**例 2:** 取 2.5% 鱼肠匀浆 0.1mL 作 AMS 测定, 测定管 OD 为 0.274, 空白管 OD 为 0.388, 2.5% 鱼肠匀浆的蛋白浓度为 0.5960mgprot/mL, 则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{AMS活力 U/mgprot} &= \frac{0.388 - 0.274}{0.388} \times \frac{0.4 \times 0.5}{10} \times \frac{30}{7.5} \div (0.1 \times 0.596) \\ &= 0.3944 \text{U/mgprot} \end{aligned}$$



#### 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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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。

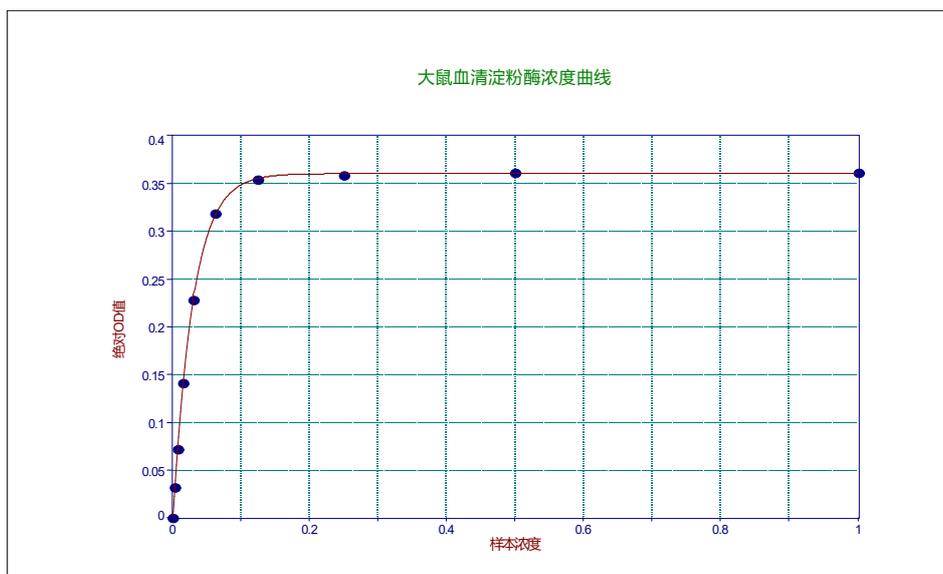
### 2、操作表:

	测定管	空白管
试剂一 (mL) 37°C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°C水浴, 准确反应 7.5 分钟		
碘应用液 (mL)	0.5	0.5
双蒸水 (mL)	3.0	3.1
混匀, 660nm 波长, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测各管吸光度。		

### 3、测定结果:

样本浓度	测定 OD 值	绝对 OD 值
空白	0.369	0.000
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 0.007813(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

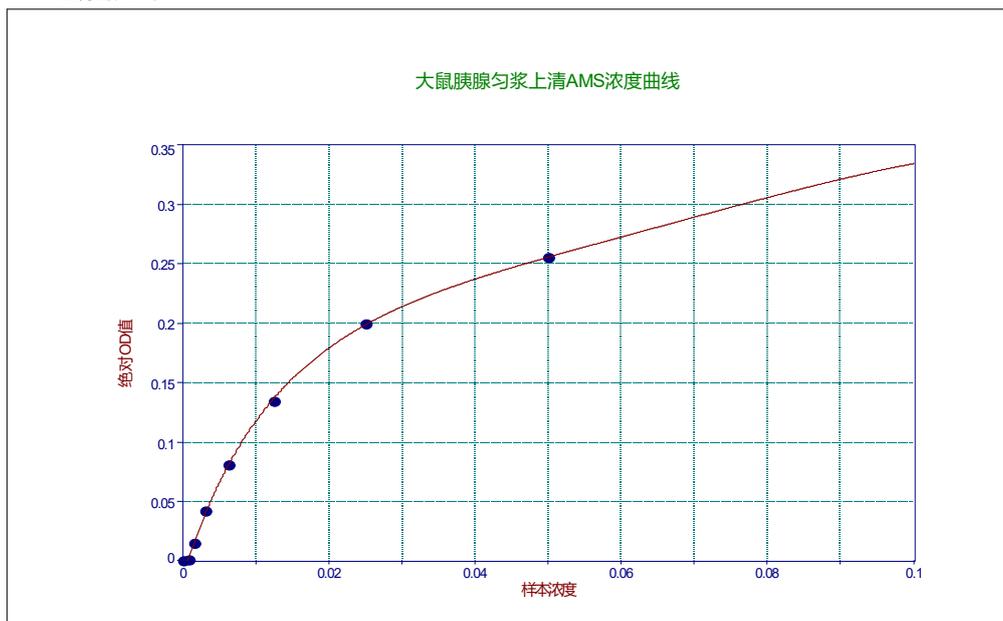
### 2、操作表：

	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
双蒸水 (mL)	3.0	3.1
混匀，660nm 波长，1cm 光径，双蒸水调零，测各管吸光度。		

### 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%。

