

# 血清淀粉酶（AMY）活性检测试剂盒（碘-淀粉比色法）说明书

微量法

规格：100T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	粉剂×1瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 30mL×1瓶	2-8°C保存
试剂三 A	粉剂×1支	2-8°C保存
试剂三 B	粉剂×1瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1瓶	2-8°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加入 12.5mL 试剂二，置于常温水中并加热至煮沸，期间不断搅拌粉剂至溶解；用不完的试剂 2-8°C保存 1 个月。
- 2、试剂三的配制：将试剂三 A 倒入试剂三 B 中，用蒸馏水定容至 10mL，2-8°C避光保存一个月。
- 3、标准品：10mg 淀粉标准品。临用前加 10mL 试剂二，置于常温水中并加热至煮沸，配成 1mg/mL 淀粉标准液。用不完的试剂 2-8°C保存 1 个月。

产品说明：

血清淀粉酶( Serum amylase, AMY) 属于  $\alpha$ -淀粉酶，以无规则方式水解多糖分子内部的 $\alpha$ -1,4 糖苷键，生成寡聚糖、麦芽糖和葡萄糖的混合物。AMY 主要由唾液腺和胰腺分泌，另外近端十二指肠、肺、子宫、泌乳期的乳腺等器官也有少量分泌。

AMY 催化淀粉分子中的 $\alpha$ -1,4 糖苷键水解，产生葡萄糖、麦芽糖以及糊精等，碘可以与未被水解的淀粉结合，生成在 570nm 下有特征吸收峰的复合物，其深浅可计算出淀粉酶的活力单位。

**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

需自备的仪器和用品：

酶标仪/可见分光光度计、恒温水浴锅/培养箱、台式离心机、可调式移液器、96 孔板/微量玻璃比色皿、研钵/匀浆器、蒸馏水。

操作步骤：

## 一、粗酶液提取

取 40 $\mu$ L 血清和 160 $\mu$ L 蒸馏水混合（即将血清稀释 5 倍），分为 2 管 100 $\mu$ L 分别作为测定管和对照管。若实验后所测数值偏大或者偏小，可以调整稀释比例（比如数值偏小可以将 80 $\mu$ L 血清和 120 $\mu$ L 蒸馏水混合即将血清稀释 2.5 倍）

## 二、测定步骤和加样表

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 570 nm，蒸馏水调零。
- 2、将淀粉标准液用蒸馏水稀释为 0.5、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625mg/mL 的标准溶液。
- 3、按操作表依次加入各试剂：

试剂(μL)	测定管	对照管	空白管 1	标准管	空白管 2
血清稀释液	100	100	-	-	-
蒸馏水	-	-	100	-	100
标准溶液	-	-	-	100	-
试剂一	100	-	100	-	-
试剂二	-	100	-	100	100
在 37°C 恒温水浴中准确保温 10min					
试剂三	50	50	50	50	50

混匀后吸取 200μL 于微量玻璃比色皿或者 96 孔板中，于 15min 内读取测定管、对照管、空白管 1、标准管、空白管 2 在 570nm 下的吸光度，分别记为 A 测定、A 对照、A 空白 1、A 标准和 A 空白 2，计算  $\Delta A_{测定} = (A_{空白 1} - A_{空白 2}) - (A_{测定} - A_{对照})$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白 2}$ 。

### 三、AMY 活性计算

#### 1、标准曲线的绘制

以  $\Delta A_{标准}$  为 y 轴，以标准溶液浓度为 x 轴，绘制标准曲线，得到方程  $y = kx + b$ 。将  $\Delta A_{测定}$  带入方程得到 x (mg/mL)。

#### 2、按照血清体积计算：

单位定义：每 mL 血清每分钟消耗 1mg 淀粉定义为 1 个酶活性单位。

$$AMY \text{ 活性 (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times F = 0.1 \times x \times F$$

V<sub>样</sub>：加入反应体系中样本体积，0.1mL；T：反应时间，10min；F：稀释倍数。

#### 注意事项：

1.  $\Delta A_{测定}$  大于 1.5 时，可以对样本进行适当稀释后测定。
2. 反应完成后需在 15min 内测定吸光度。

#### 实验实例：

- 1、取 40μL 牛血清和 160μL 蒸馏水混合（即血清稀释 5 倍）后，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算  $\Delta A_{测定} = A_{空白} - (A_{测定} - A_{对照}) = (1.409 - 0.067) - (1.297 - 0.058) = 0.103$ ，带入标准曲线  $y = 2.6047x - 0.0165$ ，计算  $x = 0.0459$ ，按公式计算活性：

$$AMY \text{ (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.1 \times x \times F = 0.1 \times x \times F = 0.0230 \text{ U/mL}$$