

糖化酶(Glucoamylase)试剂盒说明书

(货号：ADS-W-TDX026 微板法 48 样)

一、产品简介：

糖化酶，又称葡萄糖淀粉酶 (EC 3.2.1.3)，是一种外切型糖苷酶，它从淀粉的非还原性末端水解 α -1,4糖苷键和 α -1,6糖苷键，将淀粉完全水解为葡萄糖，因此广泛的应用于酒精、白酒、抗生素、氨基酸、有机酸，甘油，淀粉糖等工业中，是我国重要的工业酶制剂之一。

糖化酶水解可溶性淀粉生成葡萄糖，与 3,5-二硝基水杨酸生成红棕色化合物，在 540nm 处有最大光吸收，在一定范围内反应液颜色深浅与葡萄糖的量成正比，可测定计算得糖化酶的活力。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 1 瓶	4℃ 保存	临用前用提取液于 80℃ 水浴溶解，并定容至 10mL。
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃ 保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰。

四、糖化酶活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃ 离心 15min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取

② 细胞样本：

先收集细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细胞加入 1mL 提取液；超声波破碎细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；4℃ 约 12,000rpm 离心 10min，取上清作为待测样品。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量 (10^4)：提取液 (mL) 为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

② 所有试剂解冻至室温；

③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
-----------------	-----	-----

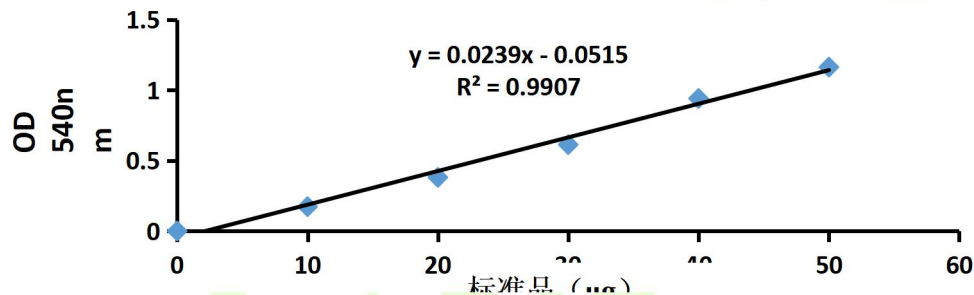
样本	10	
煮沸样本		10
试剂一	100	100
充分混匀, 40°C反应 20min		
试剂二	200	200
混匀, 沸水浴 (95-100°C) 5min, 流水冷却后, 取出 200μL 至 96 孔板中, 于 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A=A$ 测定-A 对照 (每个样本自身需做一个自身对照)。		

【注】: 1. 若 ΔA 过小, 可以延长 40°C反应时间 T (如: 40min 或更长), 或增加样本量 V1 (如增至 20μL, 则试剂二相应减小), 重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

2. 若 A 值大于 1.5, 可缩减 40°C反应时间 T (如: 10min 或更短), 或减少样本量 V1 (如减至 5μL, 则试剂二相应增加), 重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y=0.0239x-0.0515$, x 是标准品质量 (μg), y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

定义: 每毫克组织蛋白每分钟分解可溶性淀粉产生 1 μg 葡萄糖所需酶量为一个酶活单位。

糖化酶活性($\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}$)= $[(\Delta A+0.0515) \div 0.0239] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T=209.21 \times (\Delta A+0.0515) \div \text{Cpr}$

3、按样本鲜重计算:

定义: 每克组织每分钟分解可溶性淀粉产生 1 μg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

糖化酶活性($\mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$ 鲜重)= $[(\Delta A+0.0515) \div 0.0239] \div (W \times V1 \div V) \div T=209.21 \times (\Delta A+0.0515) \div W$

4、按细胞数量计算:

定义: 每 10^4 个细胞每分钟分解可溶性淀粉产生 1 μg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。糖化酶活性 ($\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}$)= $[(\Delta A+0.0515) \div 0.0239] \div (500 \times V1 \div V) \div T=0.419 \times (\Delta A+0.0515)$

5、按照液体体积计算:

定义: 每毫升液体每分钟分解可溶性淀粉产生 1 μg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

糖化酶活性($\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}$)= $[(\Delta A+0.0515) \div 0.0239] \div V1 \div T=209.21 \times (\Delta A+0.0515)$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.01mL;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 20min;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (5mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20°C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。