

## 糖化酶(Glucoamylase)试剂盒说明书

(货号：ADS-F-TDX026 分光法 24 样 有效期：3 个月)

### 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 $\alpha$ -1,4糖苷键和 $\alpha$ -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 30mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂一	粉体 1 瓶	4°C避光保存	1. 临用前用提取液于 80°C水浴溶解，并定容至 15mL； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 35mL×1 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

### 三、所需的仪器和用品：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

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°C 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°C 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 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温；

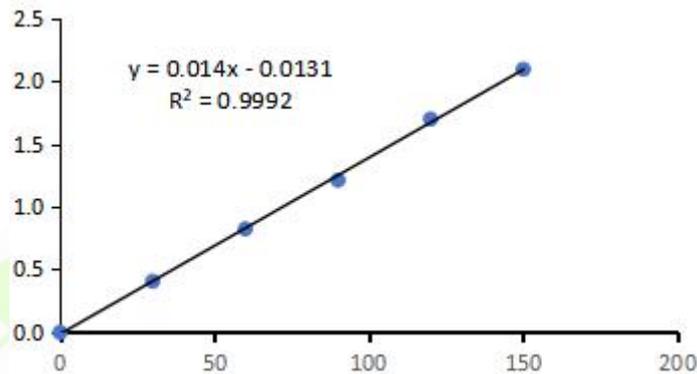
③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	30	
煮沸样本		30
试剂一	300	300
充分混匀, 40°C反应 20min		
试剂二	600	600
混匀, 沸水浴 (95-100°C) 5min, 流水冷却后, 全部转移至 1mL 玻璃比色皿中, 于 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本自身需做一个自身对照)。		

- 【注】:** 1. 若 $\Delta A$  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 60μL, 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 1.8, 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 10μL, 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:  $y = 0.014x - 0.0131$ , x 是标准品质量 (μg), y 是 $\Delta A$ 。



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 1μg 葡萄糖所需酶量为一个酶活单位。

$$\text{糖化酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0131) \div 0.014] \div (V1 \times Cpr) \div T = 119 \times (\Delta A + 0.0131) \div Cpr$$

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 1μg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{糖化酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0131) \div 0.014] \div (W \times V1 \div V) \div T = 119 \times (\Delta A + 0.0131) \div W$$

4、按细胞数量计算:

定义: 每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟分解可溶性淀粉产生 1μg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{糖化酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0131) \div 0.014] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.238 \times (\Delta A + 0.0131)$$

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 1μg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{糖化酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0131) \div 0.014] \div V1 \div T = 119 \times (\Delta A + 0.0131)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.03 mL;

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 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), 标准品母液浓度为

5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 μg/mL	0	1	2	3	4	5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	30	
蒸馏水		30
试剂一	300	300
充分混匀，40℃反应 20min		
试剂二	600	600
混匀，沸水浴 (95-100℃) 5min，流水冷却后，全部转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		