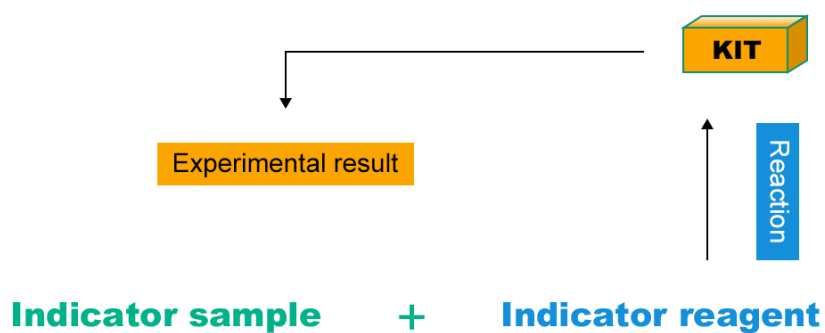


上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0516

Size: 100T/48S

## 糖化酶(Glucoamylase)检测试剂盒说明书

### 微量法

\*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 一、测定意义：

糖化酶，即葡萄糖淀粉酶（EC3.2.1.3），又称  $\gamma$ -淀粉酶，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。

#### 二、测定原理：

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。

#### 三、需自备的仪器和用品：

天平、低温离心机、研钵、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、恒温水浴锅。

#### 四、试剂的组成和配置：

| 种类                                          | 试剂规格         | 储存条件 | 使用方法及注意事项                                                                                   |
|---------------------------------------------|--------------|------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 提取液                                         | 液体 100mL×1 瓶 | 4℃保存 |                                                                                             |
| 试剂一                                         | 粉剂×1 瓶       | 4℃保存 | 临用前每瓶加入 10mL 双蒸水，置于常温水中共加热至煮沸，期间不断搅拌粉剂至溶解。                                                  |
| 试剂二                                         | 液体 10mL×1 瓶  | 4℃保存 |                                                                                             |
| 标准品                                         | 粉剂×1 支       | 4℃保存 | 含 10mg 无水葡萄糖（干燥失重<0.2%），临用前加入 1ml 蒸馏水溶解，配制成 10mg/ml 葡萄糖溶液备用，4℃可保存 1 周，或者用饱和苯甲酸溶液溶解，可保存更长时间。 |
| 标准品准备：将标准品用蒸馏水稀释至 1、0.8、0.6、0.4、0.2、0mg/ml。 |              |      |                                                                                             |

#### 五、操作步骤：

##### ●粗酶液提取：

1. 组织：按照质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液）加入提取液，冰浴匀浆后于 4℃，10000g 离心 10min，取上清置于冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10<sup>4</sup>个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 4℃，10000g 离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 培养液或其它液体：直接检测。

##### ●测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定，（在1.5mL EP 管中依次加入下列试剂）

## ●测定操作

|                                                                                                                                                                                               | 对照管 | 测定管 | 标准管 | 空白管 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| 样本 (μL)                                                                                                                                                                                       |     | 10  |     |     |
| 蒸馏水 (μL)                                                                                                                                                                                      |     |     |     | 10  |
| 标准品 (μL)                                                                                                                                                                                      |     |     | 10  |     |
| 灭活样本 (μL)                                                                                                                                                                                     | 10  |     |     |     |
| 试剂一 (μL)                                                                                                                                                                                      | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 充分混匀, 40℃反应 20min                                                                                                                                                                             |     |     |     |     |
| 试剂二 (μL)                                                                                                                                                                                      | 90  | 90  | 90  | 90  |
| 充分混匀, 95℃水浴 5min (盖紧, 防止水分散失), 流水冷却, 取 200 μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 540nm 处记录各管吸光值 A, 如果吸光值大于 2, 可以用蒸馏水稀释后测定, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。A 标准管 = $A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ |     |     |     |     |

## 六、糖化酶活性计算:

### 1、标准曲线的绘制

根据标准管吸光度 (x) 和浓度 (y, mg/ml) 建立标准曲线, 将  $\Delta A$  带入公式中计算出样品中产生的还原糖的含量 y 值 (mg/ml)

### 2、糖化酶活性的计算

#### ●按照样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

糖化酶活性 (mg/min/g 鲜重) =  $x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = x \div W \div T$

#### ●按照蛋白质浓度计算

单位定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活性单位。

$\alpha$ -淀粉酶活性 (mg/min/mg prot) =  $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = x \div C_{\text{pr}} \div T$

### ●按液体体积计算

单位定义：每 mg 液体每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活性单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性 (mg/min/ml)} = x \div T$$

V 样：加入反应体系中样本体积，0.010 mL；V 样总：提取液总体积，1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；T：反应时间，20min。

### 七、注意事项

1. 灭活样本的制备建议将样本放在沸水浴中煮沸 10min，以将酶彻底灭活。
2. 测定之前进行预实验，若吸光值大于 2，请将样品用提取液进行适当的稀释再测定，并在计算公式中乘以稀释倍数。