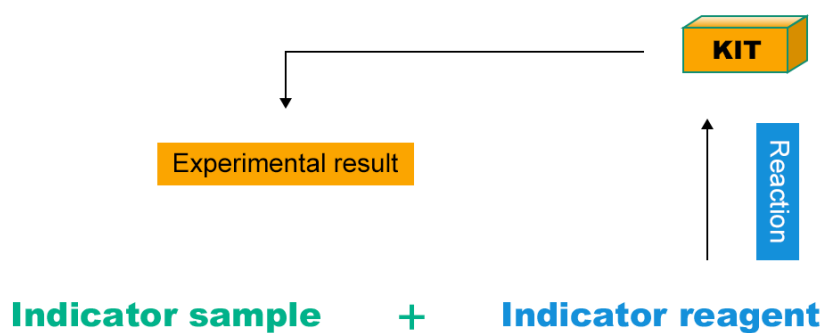


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0801

Size: 50T/24S

糖化酶(Glucoamylase) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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 γ -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 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。

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、可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿、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 50mL $\times$ 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 25mL $\times$ 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 25mL $\times$ 1 瓶	4°C 避光保存	

五、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（10⁴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。

六、测定操作

	对照管	测定管
样本（μL）		50
灭活样本（μL）	50	
试剂一（μL）	500	500
充分混匀，40℃反应 20min		
试剂二（μL）	450	450
混匀，沸水浴 5min，自来水冷却后，于 1mL 玻璃比色皿，蒸馏水调零，测定 540nm 处吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$		

七、酶活性计算公式

标准曲线：y = 0.2164x - 0.0182, R² = 0.9992

1. 按照蛋白含量计算

酶活性定义：在 40℃，pH4.6 条件下，每毫克蛋白每分钟分解可溶性淀粉产生 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{糖化酶活性 (U/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0182) \div 0.2164 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 4.62 \times (\Delta A + 0.0182) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：在 40℃，pH4.6 条件下，每克组织每分钟分解可溶性淀粉产生 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{糖化酶活性 (U/g)} = (\Delta A + 0.0182) \div 0.2164 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 4.62 \times (\Delta A + 0.0182) \div W$$

3. 按照液体体积计算

酶活性定义：在 40℃，pH4.6 条件下，每毫升培养液每分钟分解可溶性淀粉产生 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{糖化酶活性 (U/mL)} = (\Delta A + 0.0182) \div 0.2164 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 4.62 \times (\Delta A + 0.0182)$$

4. 按照细胞数量计算

酶活性定义：在 40℃，pH4.6 条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟分解可溶性淀粉产生 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{糖化酶活性 (U/10}^4\text{cell)} = (\Delta A + 0.0182) \div 0.2164 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量 (万个)} \div V_{\text{样总}}) \div T = 4.62 \times (\Delta A + 0.0182) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

V_{反总}：反应总体积，1mL，V_样：反应体系中加入样本体积，0.05mL；V_{样总}：加入提取液体积，1mL；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，30min

八、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，若吸光值较高，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。