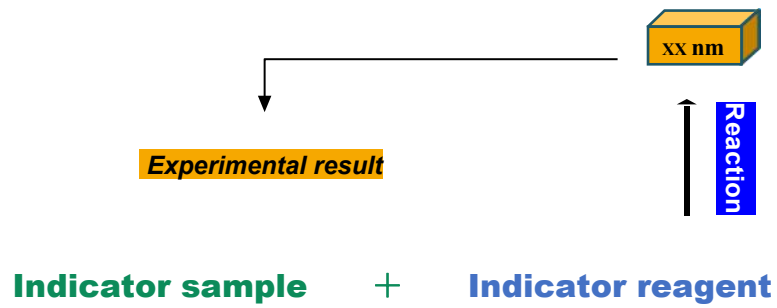


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 糖化酶(Glucoamylase) 试剂盒说明书

### 微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

产品内容：

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，置于常温水中并加热至煮沸，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。			

#### 产品说明：

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。

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。

#### 自备仪器和用品：

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。

#### 操作步骤：

##### 一、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（ $10^4$ 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。

## 二、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（ $\mu\text{L}$ ）		10		
蒸馏水（ $\mu\text{L}$ ）				10
标准品（ $\mu\text{L}$ ）			10	
灭活样本（ $\mu\text{L}$ ）	10			
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）	100	100	100	100
充分混匀，40℃反应 20min				
试剂二（ $\mu\text{L}$ ）	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 $\mu\text{L}$ 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 标准 - A 空白				

### 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

##### a. 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) =  $x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = x \div W \div T$

##### b. 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) =  $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = x \div C_{\text{pr}} \div T$

##### c. 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。

$\alpha$ -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。

### 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。