

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

### 可见分光光度法

**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。

#### 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。

#### 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。

#### 自备实验用品及仪器

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。

#### 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 50mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	液体 25mL×1 瓶	4℃避光保存	-

#### 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。

## 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°C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, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$		

### 酶活性计算公式

标准曲线:  $y = 0.2164x - 0.0182$ ,  $R^2 = 0.9992$

#### 1. 按照蛋白含量计算

酶活性定义: 在 40°C, 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°C, 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。

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

#### 3. 按照液体体积计算

酶活性定义: 在40°C, 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。

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

#### 4. 按照细胞数量计算

酶活性定义: 在40°C, pH4.6条件下, 每 $10^4$ 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。

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

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; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 30min

### 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。