

糖化酶(Glucoamylase)试剂盒说明书

(货号: G0569W 微板法 48 样)

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 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。

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 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前用提取液于 80℃水浴溶解, 并定容至 10mL。
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰。

四、糖化酶活性测定:

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℃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℃ 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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 煮沸样本的制备: 可取至少 200 μ L 待检测样本上清液于 95-100℃煮沸 10min 后, 于室温或 4℃×12000rpm 离心 10min, 上清液即为对照管的待检液。

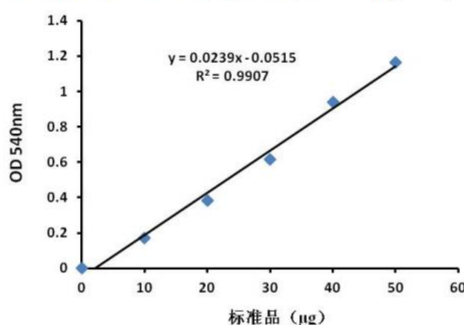
④ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	10	
煮沸样本		10
试剂一	100	100
充分混匀, 40℃反应 20min		
试剂二	200	200
混匀, 沸水浴 (95-100℃) 5min, 流水冷却后, 取出 200μL 至 96 孔板中, 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 ΔA 过小, 可以延长 40℃反应时间 T (如: 40min 或更长), 或增加样本量 V1 (如增至 20μL, 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 1.5, 可缩减 40℃反应时间 T (如: 10min 或更短), 或减少样本量 V1 (如减至 5μL, 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: $y = 0.0239x - 0.0515$, x 是标准品质量 (μg), y 是 ΔA 。



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。

糖化酶活性(μg/min/mg prot)=[$(\Delta A + 0.0515) \div 0.0239$]÷(V1×Cpr)÷T=209.21×($\Delta A + 0.0515$)÷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。

糖化酶活性(μg/min/g 鲜重)=[$(\Delta A + 0.0515) \div 0.0239$]÷(W×V1÷V)÷T=209.21×($\Delta A + 0.0515$)÷W

4、按细胞数量计算:

定义: 每 10⁴ 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。

糖化酶活性(nmol/min/10⁴ cell)=[$(\Delta A + 0.0515) \div 0.0239$]÷(500×V1÷V)÷T=0.419×($\Delta A + 0.0515$)

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。

糖化酶活性(nmol/min/mL)=[$(\Delta A + 0.0515) \div 0.0239$]÷V1÷T=209.21×($\Delta A + 0.0515$)

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.01mL;

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 制备标准品母液 (5mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20℃保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL。
- 3 依据测定管加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。