

糖化酶(Glucoamylase)试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

糖化酶，即葡萄糖淀粉酶（EC3.2.1.3），又称 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。

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。

组成：

产品名称	GMS064-50T/24S	Storage
提取液：液体	50ml	4°C
试剂一：液体	25ml	4°C
试剂二：液体	25ml	4°C避光
说明书	一份	

自备仪器和用品：

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。

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°C，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°C，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（ μ l）		50

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



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, $\Delta A = A$ 测定管 - A 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。

$$\begin{aligned} \text{糖化酶活性 (U/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0182) \div 0.2164 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 2.54 \times (\Delta A + 0.0182) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{糖化酶活性 (U/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0182) \div 0.2164 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 2.54 \times (\Delta A + 0.0182) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{糖化酶活性 (U/ml)} &= (\Delta A + 0.0182) \div 0.2164 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 2.54 \times (\Delta A + 0.0182) \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{糖化酶活性 (U/10}^4\text{cell)} &= (\Delta A + 0.0182) \div 0.2164 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量 (万个)} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 2.54 \times (\Delta A + 0.0182) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

V 反总: 反应总体积, 0.55ml, 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。

