

糖化酶(Glucoamylase)试剂盒说明书

微量法 100 管/48 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 | GMS065-100T/48S | Storage |
|--------|-----------------|---------|
| 提取液：液体 | 100ml | 4°C |
| 试剂一：液体 | 10ml | 4°C |
| 试剂二：液体 | 10ml | 4°C避光 |
| 说明书 | 一份 | |

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。

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） | | 10 |

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



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

| | | |
|--|-----|-----|
| 灭活样本 (μl) | 10 | |
| 试剂一 (μl) | 100 | 100 |
| 充分混匀, 40°C反应 20min | | |
| 试剂二 (μl) | 90 | 90 |
| 混匀, 沸水浴 5min, 自来水冷却后, 于微量石英比色皿/96 孔板, 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: $y = 0.2164x - 0.0182$, $R^2 = 0.9992$

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

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

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, 0.11ml, V 样: 反应体系中加入样本体积, 0.01ml; 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, 20min

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.1082x - 0.0182$, $R^2 = 0.9992$

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。

$$\begin{aligned}\text{糖化酶活性 (U/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0182) \div 0.1082 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 5.08 \times (\Delta A + 0.0182) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{糖化酶活性 (U/g)} &= (\Delta A + 0.0182) \div 0.1082 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 5.08 \times (\Delta A + 0.0182) \div W\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{糖化酶活性 (U/ml)} &= (\Delta A + 0.0182) \div 0.1082 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 5.08 \times (\Delta A + 0.0182)\end{aligned}$$

4. 按照细胞数量计算

酶活性定义：在 40°C，pH4.6 条件下，每 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。

$$\begin{aligned}\text{糖化酶活性 (U/10}^4\text{cell)} &= (\Delta A + 0.0182) \div 0.1082 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量 (万个)} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 5.08 \times (\Delta A + 0.0182) \div \text{细胞数量 (万个)}\end{aligned}$$

V 反总：反应总体积，0.11ml，V 样：反应体系中加入样本体积，0.01ml；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，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。

