

糖化酶(Glucoamylase)试剂盒说明书

(货号: BP10334F 分光法 24 样 有效期: 3 个月)

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 30mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂一	粉体 1 瓶	4°C避光保存	1. 临用前用提取液于 80°C水浴溶解, 并定容至 15mL; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 35mL×1 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、所需的仪器和用品:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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°C 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°C 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 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温;

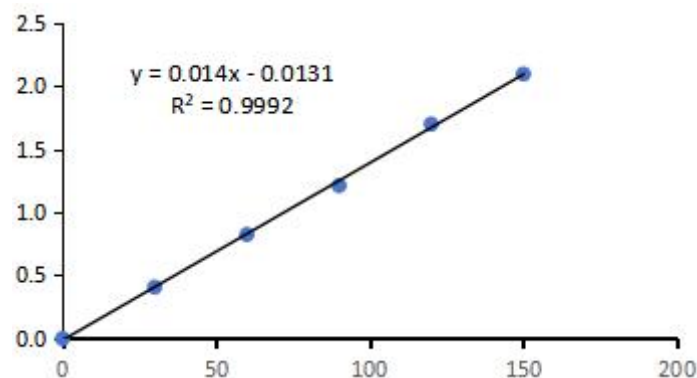
③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	30	
煮沸样本		30
试剂一	300	300
充分混匀, 40°C反应 20min		
试剂二	600	600
混匀, 沸水浴 (95-100°C) 5min, 流水冷却后, 全部转移至 1mL 玻璃比色皿中, 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°C反应时间 T (如: 40min 或更长), 或增加样本量 V1 (如增至 60μL, 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 1.8, 可缩减 40°C反应时间 T (如: 10min 或更短), 或减少样本量 V1 (如减至 10μL, 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: $y = 0.014x - 0.0131$, 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。

$$\text{糖化酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0131) \div 0.014] \div (V1 \times Cpr) \div T = 119 \times (\Delta A + 0.0131) \div Cpr$$

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。

$$\text{糖化酶活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0131) \div 0.014] \div (W \times V1 \div V) \div T = 119 \times (\Delta A + 0.0131) \div W$$

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。

$$\text{糖化酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0131) \div 0.014] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.238 \times (\Delta A + 0.0131)$$

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。

$$\text{糖化酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0131) \div 0.014] \div V1 \div T = 119 \times (\Delta A + 0.0131)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.03 mL;

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 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且 -20°C 保存), 标准品母液浓度为

5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 μg/mL	0	1	2	3	4	5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	30	
蒸馏水		30
试剂一	300	300
充分混匀，40℃反应 20min		
试剂二	600	600
混匀，沸水浴 (95-100℃) 5min，流水冷却后，全部转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		