

糖化酶(Glucoamylase)试剂盒说明书

(货号: BP10334W 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	粉体 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 提取液于 80℃水浴溶解, 并定容至 15mL; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 25mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃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、实验器材:

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)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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、检测步骤:

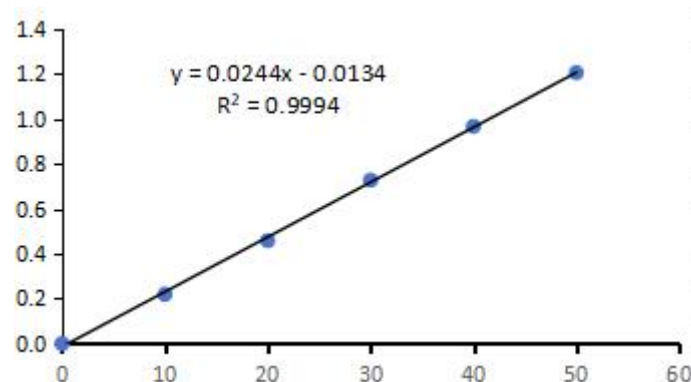
- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。
- ② 所有试剂解冻至室温；
- ③ 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (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： $y = 0.0244x - 0.0134$ ，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)=[$(\Delta A + 0.0134) \div 0.0244$]÷(V1×Cpr)÷T=204.9×($\Delta A + 0.0134$)÷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)=[$(\Delta A + 0.0134) \div 0.0244$]÷(W×V1÷V)÷T=204.9×($\Delta A + 0.0134$)÷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)=[$(\Delta A + 0.0134) \div 0.0244$]÷(500×V1÷V)÷T=0.41×($\Delta A + 0.0134$)

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)=[$(\Delta A + 0.0134) \div 0.0244$]÷V1÷T=204.9×($\Delta A + 0.0134$)

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 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），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	10	
蒸馏水		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， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		