糖化酶(Glucoamylase)试剂盒

微量法 100T/48S

注　意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

自备实验用品及仪器：

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃保存。（若出现沉淀，可以 90℃加热 5 分钟溶解后使用）试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃避光保存。

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℃，10000g 离心 10min，取上清置于冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量（104 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℃，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
样品（μL）		10
灭活样本（μL）	10	50
试剂一（μL）	100	100
充分混匀，40℃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，△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，R2 = 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℃，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。

糖化酶活性（U/mg prot）=（△A+0.0182）÷ 0.2164×V 反总÷（V 样×Cpr）÷T

=2.54×（△A+0.0182）÷ Cpr

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：在 40℃，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。

糖化酶活性（U/g）=（△A+0.0182）÷ 0.2164×V 反总÷（W×V 样÷V 样总）÷T

=2.54×（△A+0.0182）÷ W

3.按照液体体积计算

酶活性定义：在 40℃，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。

糖化酶活性（U/mL）=（△A+0.0182）÷ 0.2164×V 反总÷V 样÷T

=2.54×（△A+0.0182）

4.按照细胞数量计算

酶活性定义：在 40℃，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。

糖化酶活性（U/104cell）=（△A+0.0182）÷ 0.2164×V 反总÷（V 样×细胞数量（万个）÷V 样总）÷T

= 2.54×（△A+0.0182）÷ 细胞数量（万个）

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，R2 = 0.9992

1.按照蛋白含量计算

酶活性定义：在 40℃，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。

糖化酶活性（U/mg prot）=（△A+0.0182）÷ 0.1082×V 反总÷（V 样×Cpr）÷T = 5.08×（△A+0.0182）÷ Cpr

2.按照样本质量计算

酶活性定义：在 40℃，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。

糖化酶活性（U/g）=（△A+0.0182）÷ 0.1082×V 反总÷（W×V 样÷V 样总）÷T

=5.08×（△A+0.0182）÷ W

3.按照液体体积计算

酶活性定义：在 40℃，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。

糖化酶活性（U/mL）=（△A+0.0182）÷ 0.1082×V 反总÷V 样÷T

=5.08×（△A+0.0182）

4.按照细胞数量计算

酶活性定义：在 40℃，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。

糖化酶活性（U/104cell）=（△A+0.0182）÷ 0.1082×V 反总÷（V 样×细胞数量（万个）÷V 样总）÷T

= 5.08×（△A+0.0182）÷ 细胞数量（万个）

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。