



糖化酶活性检测试剂盒

Glucoamylase Assay Kit

微量法

产品编号: AK401M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES401	100mL×1 瓶	4℃保存
AK401-A	10mL×1 瓶	4℃保存
AK401-B	11mL×1 瓶	4℃避光保存
AK401-标准品	粉剂×1 支	临用前加入 1 mL 蒸馏水溶解, 配成 100 mg/mL 溶液备用; 4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 糖化酶 (Glucoamylase, EC3.2.1.3) 又称葡萄糖淀粉酶或 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。

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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、天平、低温离心机、研钵、恒温水浴锅。

酶液提取

1. 组织: 按照质量 (g): ES401 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g, 加入 1mL ES401) 加入 ES401, 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 (10^4 个): ES401 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL ES401), 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。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。
2. 标准品准备: 将标准品用蒸馏水稀释至 7、5、4、3、2、1mg/mL。
3. 加样表 (在 EP 管中依次加入下列试剂):

试剂名称	对照管 (μ L)	测定管 (μ L)	标准管 (μ L)	空白管 (μ L)
样本		10		
灭活样本	10			
AK401-A	100	100		
标准溶液			10	
蒸馏水			100	110
充分混匀, 40℃反应 20min				

AK401-B	90	90	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，分别记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管、A 空白管。计算 $\Delta A_{测} = A_{测定管} - A_{对照管}$ ， $\Delta A_{标} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。标准管和空白管只需做 1-2 次。				

酶活性计算公式：

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x，mg/mL）和吸光度 $\Delta A_{标}$ （y， $\Delta A_{标}$ ），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{测}$ （y， $\Delta A_{测}$ ）带入公式计算样本浓度（x，mg/mL）。

2. 酶活性计算：

（1）按照蛋白浓度计算：

酶活性定义：在 40℃ 每毫克蛋白每小时产生 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{糖化酶活性 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{样总}} \div (V_{\text{样总}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3x \div C_{\text{pr}}$$

（2）按照样本质量计算

酶活性定义：在 40℃ 每克组织每小时产生 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{糖化酶活性 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{样总}} \div W \div T = 3x \div W$$

（3）按照液体体积计算

酶活性定义：在 40℃ 每毫升液体每小时产生 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{糖化酶活性 (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 3x$$

（4）按照细胞数量计算

酶活性定义：在 40℃ 每 104 个细胞每小时产生 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{糖化酶活性 (U/104 cell)} = x \times V_{\text{样总}} \div 500 \div T = 0.006x$$

V 样：反应体系中加入的样本体积，10 μ L=0.01mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL，需自行测定；W：样本质量，g；T：反应时间，20min=0.333h；500：细胞数量，500 万。

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 ES401 进行适当的稀释再测定，并在计算公式中乘以稀释倍数。