



糖化酶活性检测试剂盒 Glucoamylase Assay Kit

可见分光光度法

产品编号：AK401V

产品规格：50T/24S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES401	50mL×1 瓶	4℃保存
AK401-A	25mL×1 瓶	4℃保存
AK401-B	30mL×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、1 mL 玻璃比色皿、天平、低温离心机、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		50		
灭活样本	50			
AK401-A	500	500		
标准溶液			50	
蒸馏水			500	550
充分混匀，40℃反应 20min				

AK401-B	450	450	450	450
混匀，沸水浴 5min，自来水冷却后，于 1mL 玻璃比色皿，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°C 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°C 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°C 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°C 每 10^4 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。

$$\text{糖化酶活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{样总}} \div 500 \div T = 0.006x$$

V 样：反应体系中加入的样本体积， $50\mu\text{L} = 0.05\text{mL}$ ；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， $20\text{min} = 0.333\text{h}$ ；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。