

Glucoamylase Activity Kit

糖化酶/葡萄糖淀粉酶试剂盒说明书

货号:BN72468 | 方法: 可见分光法 | 规格: 24 样

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保存	
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4°C保存	临用前用提取液于 80°C水浴溶解, 并定容至 10mL。
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰。

四、糖化酶活性测定:

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

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

③ 煮沸样本的制备: 可取至少 200 μ L 待检测样本上清液于 95-100°C煮沸 10min 后, 于室温或 4°C×12000rpm 离心 10min, 上清液即为对照管的待检液。

④ 在 EP 管中依次加入:

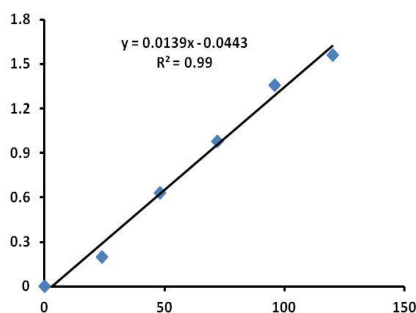
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	30	
煮沸样本		30
试剂一	300	300
充分混匀, 40°C反应 20min		
试剂二	600	600
混匀, 沸水浴 (95-100°C) 5min, 流水冷却后, 全部转移至 1mL 玻璃比色皿中, 于 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本自身需做一个自身对照)。		

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调;

针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0139x - 0.0443$, x 是标准品质量 (μg), y 是 ΔA 。



标准曲线示意图

说明: 标准曲线由标准品测定获得, 具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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) = $[(\Delta A + 0.0443) \div 0.0139] \div (V1 \times Cpr) \div T = 119.9 \times (\Delta A + 0.0443) \div Cpr$

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。

糖化酶活性(μg/min/g 鲜重) = $[(\Delta A + 0.0443) \div 0.0139] \div (W \times V1 \div V) \div T = 119.9 \times (\Delta A + 0.0443) \div W$

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。

糖化酶活性(nmol/min/10⁴ cell) = $[(\Delta A + 0.0443) \div 0.0139] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.24 \times (\Delta A + 0.0443)$

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) = $[(\Delta A + 0.0443) \div 0.0139] \div V1 \div T = 119.9 \times (\Delta A + 0.0443)$

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。