

糖化酶活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10485

规格: 50T/24S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 35 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂一: 临用前加入 40 mL 提取液, 充分混匀后沸水浴直至溶解 (约 10min);
- 2、标准品: 10 mg 无水葡萄糖。临用前加 1 mL 提取液溶解为 10 mg/mL 的葡萄糖标准品备用, 4°C保存一周;

产品说明:

糖化酶, 即葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3), 又称 γ -淀粉酶。糖化酶是由一系列微生物分泌的, 具有外切酶活性的胞外酶, 主要作用是从淀粉、糊精、糖原等碳链上的非还原性末端依次水解 α -1,4糖苷键, 切下一个个葡萄糖单元, 对于支链淀粉, 当遇到分支点时, 它也可以水解 α -1,6 糖苷键由此将支链淀粉全部水解成葡萄糖。多应用于酒精、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。

糖化酶将可溶性淀粉生成葡萄糖, 碱性条件下, 葡萄糖与3,5-二硝基水杨酸共热后生成红棕色化合物, 在540nm处有最大光吸收, 在一定范围内葡萄糖的量与反应液颜色深浅成正比, 以此测定糖化酶的活力。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

天平、低温离心机、可见分光光度计、1 mL玻璃比色皿、恒温水浴锅、研钵/匀浆器/超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1. 按照组织质量 (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°C, 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): 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°C, 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。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热 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 1.5、1.0、0.8、0.4、0.2、0.1mg/mL。
3. 吸取 50 μ L 样本于 1.5mLEP 管中沸水浴 5min 作为对照管的灭活样本。
4. 加样表：

试剂 (μ L)	对照管	测定管	空白管	标准管
灭活样本	50			
样本		50		
蒸馏水			50	
标准品				50
试剂一	500	500	500	500
充分混匀，40 $^{\circ}$ C反应20min后沸水浴5min，常温10000g离心10min。				
上清液	500	500	500	500
试剂二	500	500	500	500
混匀，沸水浴5min，流水冷却后，测定540nm处吸光值A，计算 $\Delta A_{测}=A_{测定管}-A_{对照管}$ ， $\Delta A_{标}=A_{标准管}-A_{空白管}$ 。				

三、糖化酶活性计算

1. 标准曲线的绘制：

以标准管的浓度为x轴，对应的 $\Delta A_{标}$ 为y轴绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{测}$ 带入方程中计算得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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 μ L=0.05mL；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:

测定之前进行预实验,若吸光值较高,请将样本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。

实验实例:

1、取 0.1g 玉兰叶片加入 1mL 提取液冰浴匀浆后于 4°C, 10000g 离心 10min, 取上清置于冰上, 之后按照测定步骤操作, 测得计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.738 - 0.584 = 0.154$, 带入标准曲线 $y = 0.7372x + 0.0175$, 计算 $x = 0.18516$, 按样本质量计算酶活得:

糖化酶活性 (U/g 质量) $= 3x \div W = 5.55$ U/g 质量。

2、取 0.1g 肝脏加入 1mL 提取液冰浴匀浆后于 4°C, 10000g 离心 10min, 取上清置于冰上, 之后按照测定步骤操作, 测得计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 1.420 - 1.282 = 0.138$, 带入标准曲线 $y = 0.7372x + 0.0175$, 计算 $x = 0.163$, 按样本质量计算酶活得:

糖化酶活性 (U/g 质量) $= 3x \div W = 4.89$ U/g 质量。

3、取兔血清按照测定步骤操作, 测得计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 1.447 - 0.753 = 0.694$, 带入标准曲线 $y = 0.7372x + 0.0175$, 计算 $x = 0.918$, 按照液体体积计算:

糖化酶活性 (U/mL) $= 3x = 2.754$ U/mL。