

## $\alpha$ -葡萄糖苷酶 ( $\alpha$ -Glucosidase, $\alpha$ -GC) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

**注 意：**正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义：

$\alpha$ -GC(EC 3.2.1.20)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，催化水解芳基或烃基与糖基之间的  $\alpha$ -糖苷键生成葡萄糖，不仅与细胞壁的松弛或加固有关，而且与细胞识别和一些信号分子产生密切相关。

### 测定原理：

$\alpha$ -GC 分解对-硝基苯- $\alpha$ -D 吡喃葡萄糖苷生成对-硝基苯酚，后者在 400nm 有最大吸收峰，通过测定吸光值升高速率来计算  $\alpha$ -GC 活性。

### 自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；临用前加入 12mL 蒸馏水，充分溶解备用；用不完的试剂仍-20℃ 保存。

试剂二：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存。

### 粗酶液提取：

1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 ( $10^4$  个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液)，超声波破碎细菌或细胞 (冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)；15000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、组织：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 组织，加入 1mL 提取液)，进行冰浴匀浆。15000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

**测定步骤：**

- 1、 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 400nm，蒸馏水调零。
- 2、 加样表

| 试剂名称（μL） | 测定管 | 对照管 |
|----------|-----|-----|
| 试剂一      | 120 |     |
| 蒸馏水      |     | 120 |
| 试剂二      | 150 | 150 |
| 样本       | 30  | 30  |

充分混匀，放入 37℃ 准确水浴 30min 后，立即放入 95℃ 水浴 5min（盖紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀（以保证浓度不变），8000g，4℃，离心 5min，取上清液（在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂）

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 上清液 | 70  | 70  |
| 试剂三 | 130 | 130 |

充分混匀，室温静置 2min 后，400nm 处测定吸光值 A，计算  $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。  
每个测定管需设一个对照管。

**α-GC 活力计算：**

**a. 微量石英比色皿测定的计算公式如下**

标准条件下测定的回归方程为  $y = 0.00585x - 0.0027$ ；x 为标准品浓度（nmol/mL），y 为吸光值。

**（1）按样本蛋白浓度计算：**

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 56.98 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

**（2）按样本鲜重计算：**

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 56.98 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

**（3）按细菌或细胞密度计算：**

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.114 \times (\Delta A + 0.0027)$$

V 反总：反应体系总体积，0.3mL；V 样：加入反应体系中样本体积，0.03mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万；T：反应时间，30min。

**b.用 96 孔板测定的计算公式如下**

标准条件下测定的回归方程为  $y = 0.0039x - 0.0027$ ;  $x$  为标准品浓度 (nmol/mL),  $y$  为吸光值。

**(1) 按样本蛋白浓度计算:**

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-GC 活性(nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 85.47 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

**(2) 按样本鲜重计算:**

单位的定义: 每 g 组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-GC 活性(nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 85.47 \times (\Delta A + 0.0027) \div W\end{aligned}$$

**(3) 按细菌或细胞密度计算:**

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-GC 活性(nmol/min/10}^4\text{cell)} &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.171 \times (\Delta A + 0.0027)\end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积, 0.3mL;  $V_{\text{样}}$ : 加入反应体系中样本体积, 0.03mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL;  $W$ : 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万;  $T$ : 反应时间, 30min。

Lifemall.asia

To be with you