

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

分光光度法 50 管/24 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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：粉剂×2 瓶，-20℃ 保存；临用前每瓶加入 10mL 蒸馏水，充分溶解备用；用不完的试剂仍-20℃ 保存。

试剂二：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 50mL×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       | 400 |     |
| 蒸馏水       |     | 400 |
| 试剂二       | 500 | 500 |
| 样本        | 100 | 100 |

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

|     |      |      |
|-----|------|------|
| 上清液 | 500  | 500  |
| 试剂三 | 1000 | 1000 |

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：**

标准条件下测定的回归方程为  $y = 0.00543x - 0.0027$ ；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力单位。

$$\alpha\text{-GC 活力}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(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力单位。

$$\alpha\text{-GC 活力}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(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力单位。

$$\alpha\text{-GC 活力}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.123 \times (\Delta A + 0.0027)$$

V 反总：反应体系总体积，1mL；V 样：加入反应体系中样本体积，0.1mL；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。