

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0428

Size: 100T/48S

α -葡萄糖苷酶 (α -GC) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

α -GC (EC 3.2.1.20) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 催化水解芳基或羟基与糖基之间的 α -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。

二、测定原理:

α -GC 分解对-硝基苯- α -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 α -GC 活性。

三、需自备的仪器和用品:

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

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前每瓶加入 12mL 双蒸水，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	
标准品	液体×1 支	5 μmol/mL 的对硝基苯酚溶液	

五、粗酶液提取：

1. 细菌或培养细胞的处理：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 1000 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次）15000g，4℃，离心 20min，取上清，置冰上待测。
2. 组织的处理：称取约 0.2g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆；15000g，4℃，离心 20min，取上清，置冰上待测。
3. 标准样品的准备：取 100 μL 标准液，加入到 400 μL 试剂三中，得到 1 μmol/mL 标准液，十倍稀释到 100nmol/mL，用蒸馏水倍比稀释：50、25、12.5、6.25、0 nmol/mL。100、50、25、12.5、6.25、0 nmol/mL 做标准液。

六、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	标准管
试剂一	100		
试剂二	150	150	
样本	30	30	
充分混匀，放入 37℃准确水浴 30min 后，立即放入沸水浴中煮沸 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）			
试剂一		100	
充分混匀，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	
标准液			70
试剂三	130	130	130
充分混匀，室温静置 2min 后，400nm 处测定吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。			

七、α-GC 活力计算：

1、标准曲线建立：根据标准管的浓度（y）和吸光度（x，各标准管减去浓度为 0 的标准管为标准管A）建立标准曲线。

2、根据标准曲线，将 ΔA （x）带入公式计算样品产物浓度（nmol/mL）

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg 组织蛋白在每 mL 体系中每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

GC 活力 (U/mg prot)=(y×V 反总)÷(V 样×Cpr)÷T=18.67×y÷

Cpr

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 组织在每 mL 体系中每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

GC 活力 (U/g 鲜重) = (y×V 反总)÷(W×V 样÷V 样总)÷T=18.67×y÷W

(3) 按细菌或细胞数量计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞在每 mL 体系中每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

GC 活力 (U/10⁴ cell)=(y×V 反总)÷(1000×V 样÷V 样总)÷T=0.0187×y

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.28mL; 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; W: 样品质量, g; 1000: 细胞或细菌总数, 1000 万; T: 反应时间, 0.5h。