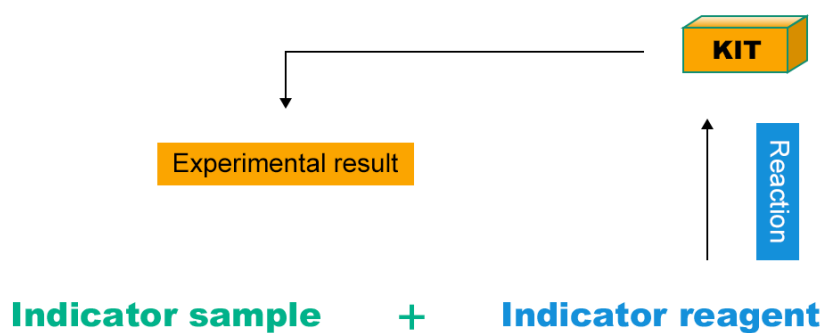


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0706

Size: 50T/24S

α -葡萄糖苷酶 (α -GC) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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、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。

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 50mL $\times$ 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉剂 $\times$ 2 瓶	-20°C 保存	临用前每瓶加入 10mL 双蒸水, 充分溶解备用; 用不完的试剂仍-20°C 保存。
试剂二	液体 25mL $\times$ 1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 80mL $\times$ 1 瓶	4°C 保存	
标准品	液体 $\times$ 1 支	4°C 保存	5 μ mol/mL 的对硝基苯酚溶液

五、操作步骤：

● 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），5000g，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，稀释液用试剂二。100、50、25、12.5、6.25、0 nmol/mL 做标准液。

● 测定步骤和加样表：

(1) 分光光度计预热 30min 以上，调节波长 400nm，蒸馏水调零。

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管
试剂一	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		400	
充分混匀，8000g，4℃，离心 5min，取上清液			
上清液	500	500	
标准液			500
试剂三	1000	1000	1000
充分混匀，室温静置 2min 后，用蒸馏水调零，400nm 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。			

六、 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。

$$\alpha\text{-GC 活力 (U/mg prot)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 20 \times y \div C_{\text{pr}}$$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒（ZC-S0470）。

（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。

$$\alpha\text{-GC 活力 (U/g 鲜重)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 20 \times y \div W$$

（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。

$$\alpha\text{-GC 活力 (U/10}^4\text{ cell)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (1000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.02 \times y$$

C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，1mL； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中样本体积，0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：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。