

葡萄糖脱氢酶（Glucose dehydrogenase, GCDH）试剂盒说明书

（货号：BP10218F 分光法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

GCDH (EC 1.1.1.47) 属于氧化还原酶家族，催化 D-葡萄糖和 NAD(P) 生成 D-葡萄糖酸和 NAD(P)H，参与戊糖磷酸途径。GCDH 催化 D-葡萄糖和 NAD 生成 D-葡萄糖酸和 NADH，在 340nm 下测定 NADH 上升速率，即可反映 GCDH 活性。传统方法是检测 NADH 在 340nm 处的吸光值。由于 NADH 的摩尔消光系数 (ϵ) 较低，所以这种方法灵敏度低，且严重受到干扰。

本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法：该酶促过程产生的 NADH 与特异的显色剂反应，产生在 450nm 处有最大吸收峰的可有物质，通过检测该有色物质在 450nm 的增加速率，进而计算出葡萄糖脱氢酶活性的大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 38mL 试剂一充分溶解，用不完的试剂仍 4℃ 保存。
试剂三	液体 2.1mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
标准品	粉剂 1 支	-20℃ 保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取

① 组织样本：

取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可以按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 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）；12000rpm, 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

① 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

② 试剂放在 37℃ 水浴 5min；

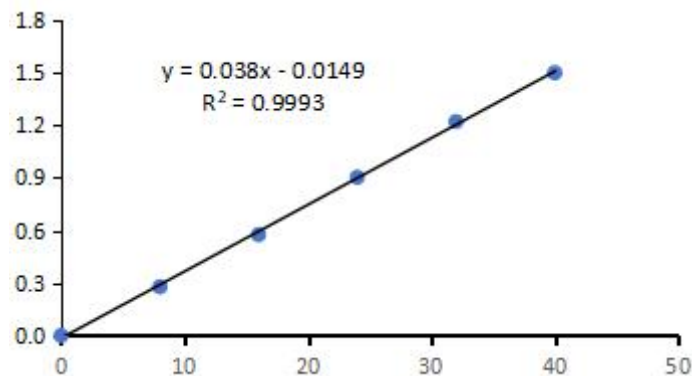
③ 在 1mL 玻璃比色皿中按照下表依次加入试剂：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	40
试剂二	720
试剂三	40
混匀，立即 450nm 下读取 A1 值，20min 后读取 A2 值， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：若 ΔA 过小，可以延长反应时间（如：30min 或更长），重新调整的反应时间值要代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.038x - 0.0149$ ；x 是 NADH 摩尔质量：nmol，y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化 1 nmolNAD⁺生成 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCDH (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0149) \div 0.038] \div (V1 \times Cpr) \div T = 32.9 \times (\Delta A + 0.0149) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算

单位定义：每克组织每分钟催化 1 nmolNAD⁺生成 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCDH (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0149) \div 0.038] \div (W \times V1 \div V) \div T = 32.9 \times (\Delta A + 0.0149) \div W$$

4、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生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0149) \div 0.038] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.066 \times (\Delta A - 0.0009)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.04 mL；

T---反应时间，20 min；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；

W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，500 万。

附：标准曲线制作过程：

1 向标准品 EP 管里面加入 1.41ml 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存），标准品母液浓度为 1nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 nmol /μL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 nmol /μL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液	0	40	80	120	160	200

uL						
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	40	
蒸馏水		40
试剂二	720	720
试剂三	40	40
混匀，立即 450nm 下读取 A 值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - 0 \text{ 浓度管}$ 。		