

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

（货号：BP10218W 微板法 96 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 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 19mL 试剂一充分溶解，用不完的试剂仍 4℃ 保存。
试剂三	液体 1.1mL×EP 管	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）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、葡萄糖脱氢酶（GCDH）活性测定：

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：

建议称取约 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/培养细胞：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

② 试剂放在 37℃ 水浴 5min；

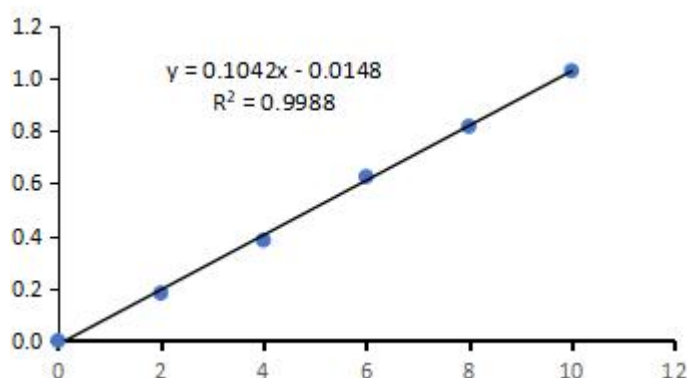
③ 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	10
试剂二	180
试剂三	10
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: $y = 0.1042x - 0.0148$; 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 nmol NAD⁺ 生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

GCDH (nmol/min/mg prot) = $[(\Delta A + 0.0148) \div 0.1042] \div (V1 \times Cpr) \div T = 48 \times (\Delta A + 0.0148) \div Cpr$

3、按样本鲜重计算

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

GCDH (nmol/min/g 鲜重) = $[(\Delta A + 0.0148) \div 0.1042] \div (W \times V1 \div V) \div T = 48 \times (\Delta A + 0.0148) \div W$

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。

GCDH (nmol/min/10⁴ cell) = $[(\Delta A + 0.0148) \div 0.1042] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.096 \times (\Delta A + 0.0148)$

V----加入提取液体积, 1 mL;

V1----加入样本体积, 0.01 mL;

T----反应时间, 20 min;

Cpr----样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒;

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 1 nmol/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 uL	0	40	80	120	160	200
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	10	
蒸馏水		10
试剂二	180	180
试剂三	10	10
混匀，立即 450nm 下读取 A 值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		