

α -葡萄糖苷酶 (α -Glucosidase, α -GC) 试剂盒说明书

(货号: BP10280W 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

α -葡萄糖苷酶 (α -GC, EC 3.2.1.20) 又叫 α -D-葡萄糖苷水解酶, 广泛分布于动植物和微生物中, 是一类能够从含有 α -糖苷键底物的非还原端催化水解 α -1,4-糖苷键, 释放出葡萄糖, 或将游离出的葡萄糖残基转移到另一糖类底物形成 α -1,6 糖苷键, 从而得到低聚异麦芽糖或糖酯、糖肽等物质。 α -葡萄糖苷酶与淀粉及糖原等糖代谢密切相关, 对维持生物体的正常生理功能起着重要作用。

α -葡萄糖苷酶可以水解对-硝基苯- α -D 吡喃葡萄糖苷生成对-硝基苯酚, 后者在 405nm 有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率来计算 α -葡萄糖苷酶活性。

二、试剂盒的组成和配制:

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	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 2.5mL 蒸馏水溶解, 4℃ 保存。
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 32mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃ 避光保存	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、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 (水分充足的样本取 0.5g), 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, 可按照组织质量 (g): 提取液 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

② 细菌或细胞: 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); 12000 rpm, 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): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。

② 在 EP 管中依次加入:

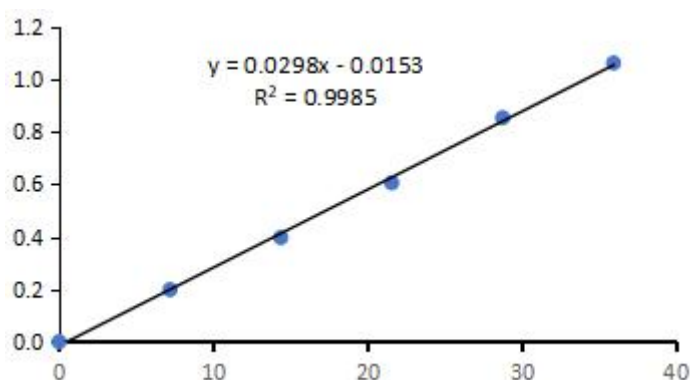
试剂组分 (μ L)	测定管	对照管
样本	10	10

试剂一	40	
蒸馏水		40
试剂二	50	50
迅速混匀, 37°C保温 30min		
试剂三	300	300
混匀, 取 200μL 至 96 孔板中, 405nm 处测定吸光值 A, ΔA=A 测定-A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。		

【注】若ΔA 较小, 可以增加 37°C保温反应时间 (如 1 小时), 或者增加样本上样量 V1 (如增至 30μL, 则试剂二相应减少), 则改变后的反应时间 T 或加样体积 V1 需重新代入计算公式计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0298x - 0.0153$; x 是 PNP 摩尔质量 (nmol), y 是 ΔA。



2、按样本蛋白浓度计算:

定义: 每毫克组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0153) \div 0.0298] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D$$

$$= 111.9 \times (\Delta A + 0.0153) \div \text{Cpr} \times D$$

3、按样本鲜重计算:

定义: 每克组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0153) \div 0.0298] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 111.9 \times (\Delta A + 0.0153) \div W \times D$$

4、按细菌或细胞密度计算:

定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0153) \div 0.0298] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 0.224 \times (\Delta A + 0.0153) \times D$$

5、按液体体积计算:

定义: 每毫升样本每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0153) \div 0.0298] \div V1 \div T \times D = 111.9 \times (\Delta A + 0.0153) \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL; V1---加入反应体系中样本体积, 10μL=0.01mL;

W---样本质量, g; 500---细胞或细菌总数, 万;

T---反应时间, 30min; PNP 对分子质量---139.11;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

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。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水，标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/mL。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：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 0.5mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
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	40	50
试剂二	50	50
试剂三	300	300
混匀，取 200μL 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值， $\Delta A = A - \text{测定} - 0 \text{ 浓度管}$ 。		