

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

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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, 催化水解芳基或烃基与糖基之间的 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。

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。

组成:

产品名称	GMS026-50T/24S	Storage
提取液: 液体	50ml	4°C
试剂一: 粉剂	2 瓶	-20°C
试剂二: 液体	25ml	4°C
试剂三: 液体	50ml	4°C
说明书	一份	

试剂一: 粉剂 \times 2 瓶, -20°C 保存; 临用前每瓶加入 10ml 蒸馏水, 充分溶解备用; 用不完的试剂仍-20°C 保存。

自备仪器和用品:

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。

粗酶液提取:

- 1、细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 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 (建议 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); 15000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 2、组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积(ml) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1ml 提取液), 进行冰浴匀浆。15000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



1、分光光度计预热 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
试剂一	400	
蒸馏水		400
试剂二	500	500
样本	100	100

充分混匀，放入 37°C 准确水浴 30min 后，立即放入 95°C 水浴 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），8000g，4°C，离心 5min，取上清液

上清液	500	500
试剂三	1000	1000

充分混匀，室温静置 2min 后，400nm 处测定吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

α-GC 活力计算：

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.00543x - 0.0027$ ；x 为标准品浓度 (nmol/ml)，y 为吸光值。

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-GC 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-GC 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-GC 活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.123 \times (\Delta A + 0.0027)$$

V 反总：反应体系总体积，1ml；V 样：加入反应体系中样本体积，0.1ml；V 样总：加入提取液体积，1ml；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/ml；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万；T：反应时间，30min。

