

α-葡萄糖苷酶 (α-Glucosidase, α-GC) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TDX013 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	4°C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°C保存。
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 32mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C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、所需的仪器和用品:

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:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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°C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°C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(10⁴): 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、上机检测:

① 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 405nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

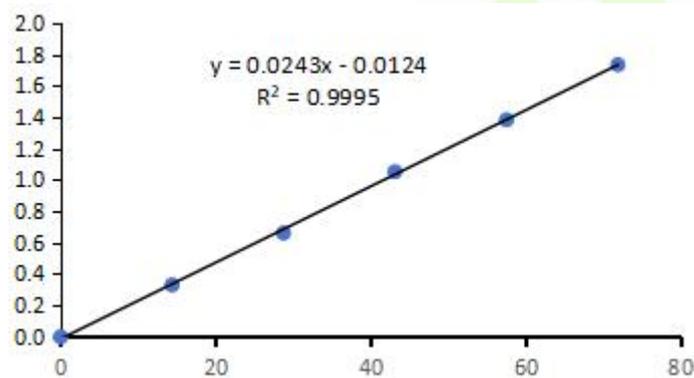
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20

试剂一	80	
蒸馏水		80
试剂二	100	100
迅速混匀, 37°C保温 30min		
试剂三	600	600
混匀, 全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中, 405nm 处测定吸光 A, $\Delta A = A$ 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 (如增至 60 μ L, 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: $y = 0.0243x - 0.0124$; 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。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0124) \div 0.0243] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D$$

$$= 68.59 \times (\Delta A + 0.0124) \div Cpr \times D$$

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。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0124) \div 0.0243] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 68.59 \times (\Delta A + 0.0124) \div W \times D$$

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) 为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0124) \div 0.0243] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 0.137 \times (\Delta A + 0.0124) \times D$$

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。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0124) \div 0.0243] \div V1 \div T \times D = 68.59 \times (\Delta A + 0.0124) \times D$$

- V----加入提取液体积, 1mL; V1----加入反应体系中样本体积, 20 μ L=0.02mL;
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	20	
蒸馏水	80	100
试剂二	100	100
试剂三	600	600
混匀，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 405nm 下读取吸光值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		