

# 组织及血液 $\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -GC) 活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHB2-C24	组织及血液 $\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -GC) 试剂盒	24T	常量法

## 产品说明:

$\alpha$ -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 $\alpha$ -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。

$\alpha$ -GC分解对-硝基苯- $\alpha$ -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 $\alpha$ -GC活性。

## 试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂二	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 80 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

## 溶液的配制:

- 1、试剂一:临用前取 1 瓶加入 10 mL 蒸馏水,充分溶解备用;用不完的试剂-20℃保存4 周,避免反复冻融。
- 2、标准品: 5  $\mu$ mol/mL 的对硝基苯酚溶液。

## 操作步骤:

### 一、样本处理

1、细菌或培养细胞的处理:收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;按照每 1000 万细菌或细胞加入 1mL 提取液,超声波破碎细菌或细胞(功率200W,超声3 秒,间隔 10 秒,重复30 次),15000g, 4℃, 离心20min, 取上清,置冰上待测。

2、组织的处理:称取约0.2g 组织,加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆;15000g, 4℃, 离心20min, 取上清,置冰上待测。

3、液体样本:直接检测。若溶液有浑浊需离心后取上清进行测定。

### 二、测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上,调节波长 400nm,蒸馏水调零。

2、标准溶液的稀释:将5 $\mu$ mol/mL 的标准液用蒸馏水稀释成 100、50、25、12.5、6.25、0 nmol/mL 标准溶液待测。

3、标准液稀释可参考下表:

序号	稀释前浓度 (nmol/mL)	标准液体积 ( $\mu$ L)	蒸馏水体积 ( $\mu$ L)	稀释后浓度 (nmol/mL)
----	-----------------	------------------	------------------	-----------------

1	5000	100	400	1000
2	1000	200	1800	100
3	100	1000	1000	50
4	50	1000	1000	25
5	25	1000	1000	12.5
6	12.5	1000	1000	6.25
7	6.25	0	1000	0 (空白管)

备注：实验中每个标准管需 500 $\mu$ L 标准溶液。

#### 4、加样表

试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管	对照管	标准管
试剂一	400		
试剂二	500	500	
样本	100	100	
充分混匀，放入37 $^{\circ}$ C水浴锅/恒温培养箱中准确反应30min后，立即放入沸水浴中煮沸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）			
试剂一		400	
充分混匀，8000g，4 $^{\circ}$ C，离心5min，取上清液待测			
上清液	500	500	
标准液			500
试剂三	1000	1000	1000
充分混匀，室温静置2min后，于400nm处测定吸光值A，分别记为A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管。计算 $\Delta A_{测定}=A_{测定管}-A_{对照管}$ 。 $\Delta A_{标准}=A_{标准管}-A_{空白管}$ 。每个测定管需设一个对照管。标准曲线和空白管只需测 1-2 次。			

### 三、 $\alpha$ -GC活力计算

#### 1、标准曲线建立：

根据标准管的浓度（x，nmol/mL）和吸光度（y， $\Delta A$ 标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A$ （y， $\Delta A$ 测定）代入公式计算样本产物浓度x（nmol/mL）。

#### 2、 $\alpha$ -GC活力计算

##### (1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白在每mL体系中每小时产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-GC活力 (U/mg prot)} = (x \times V_{\text{反总}}) \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 20x \div C_{\text{pr}}$$

##### (2) 按样本质量计算：

单位的定义：每g组织在每mL体系中每小时产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。 $\alpha$ -GC活力(U/g质量) =  $(x \times V_{\text{反总}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 20x \div W$

##### 3) 按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每1万个细菌或细胞在每mL体系中每小时产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-GC活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = (x \times V_{\text{反总}}) \div (1000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.02x$$

---

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL, 蛋白浓度需要另外测定; 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; W: 样本质量, g; 1000: 细胞或细菌总数, 1000万; T: 反应时间, 0.5h。

注意事项:

提取液中含有使蛋白变性的成分, 故按蛋白浓度计算时需要重新提取蛋白进行测定。