

组织及血液 α -葡萄糖苷酶(α -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-M48	组织及血液 α -葡萄糖苷酶(α -GC) 试剂盒	48T	微量法

产品说明：

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。

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。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂二	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 15 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6 mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂建议-20℃分装保存4 周，避免反复冻融；
- 2、标准品：5 μ 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、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至400nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、标准溶液的稀释：将5 μ 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 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	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 70μL 标准溶液。

4、加样表

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管
试剂一	100		
试剂二	150	150	
样本	30	30	
充分混匀，放入37℃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		100	
充分混匀，8000g，4℃，离心5min，取上清液（在EP管或96孔板中加入下列试剂）			
上清液	70	70	
标准液			70
试剂三	130	130	130
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ΔA 测定=A 测定管-A 对照管。ΔA 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、α-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, ΔA标准)，建立标准曲线。根据标准曲线，将ΔA (y, ΔA 测定) 代入公式计算样本产物浓度x (nmol/mL)。

2、α-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。

$$GC活力 (U/mg prot) = (x \times V反总) \div (V样 \times Cpr) \div T = 18.67x \div Cpr$$

(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。

$$GC活力 (U/g 质量) = (x \times V反总) \div (W \times V样 \div V样总) \div T = 18.67x \div W$$

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。

$$\text{GC活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = (x \times V_{\text{反总}}) \div (1000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.0187x$$

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, 0.28mL; V样: 加入反应体系中样本体积, 0.03mL; 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。