

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

(货号: BN72103 分光法 24 样)

### 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℃ 保存 |                                       |
| 试剂一  | 粉剂 mg×1 瓶   | 4℃ 保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 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 mg×1 支   | 4℃ 保存 | 若重新做标曲, 则用到该试剂。                       |

### 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰。

### 四、α-葡萄糖苷酶 (α-GC) 活性测定:

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。15000rpm, 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): 提取液体积 (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); 15000 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<sup>4</sup> 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

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:

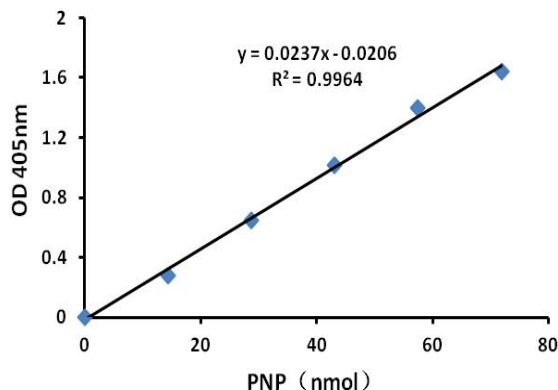
| 试剂名称 (μL)          | 测定管 | 对照管 |
|--------------------|-----|-----|
| 样本                 | 20  | 20  |
| 试剂一                | 80  |     |
| 蒸馏水                |     | 80  |
| 试剂二                | 100 | 100 |
| 迅速混匀, 37℃ 保温 30min |     |     |

|                                                                                                 |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管需设一个对照管）。 |     |     |

【注】若  $\Delta A$  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  $\mu\text{L}$ ，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： $y = 0.0237x - 0.0206$ ；x 是 PNP 摩尔质量（nmol），y 是  $\Delta A$ 。



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。

$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0206) \div 0.0237] \div (V1 \times Cpr) \div T = 70.32 \times (\Delta A + 0.0206) \div Cpr$

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。

$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0206) \div 0.0237] \div (W \times V1 \div V) \div T = 70.32 \times (\Delta A + 0.0206) \div W$

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。

$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0206) \div 0.0237] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.14 \times (\Delta A + 0.0206)$

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。

$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0206) \div 0.0237] \div V1 \div T = 70.32 \times (\Delta A + 0.0206)$

V----加入提取液体积，1mL；

V1----加入反应体系中样本体积，20  $\mu\text{L}$  = 0.02mL；

W----样本质量，g；

500----细胞或细菌总数，500 万；

T----反应时间，30min；

PNP 对分子质量----139.11；

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 制备标准品母液（1mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管中依次加入：20  $\mu\text{L}$  标准品 + 80  $\mu\text{L}$  蒸馏水 + 100  $\mu\text{L}$  试剂二 + 600  $\mu\text{L}$  试剂三，混匀，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。