

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

(微板法 48 样)

## 一、产品简介:

$\alpha$ -葡萄糖苷酶 ( $\alpha$ -GC, EC 3.2.1.20) 又叫 $\alpha$ -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 $\alpha$ -糖苷键底物的非还原端催化水解  $\alpha$ -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 $\alpha$ -1, 6 糖苷键, 从而得到低聚异麦芽糖或糖酯、糖肽等物质。 $\alpha$ -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。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶可以水解对-硝基苯- $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 60mL×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:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

## 四、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶 ( $\alpha$ -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 ( $10^4$  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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。

② 在 EP 管中依次加入:

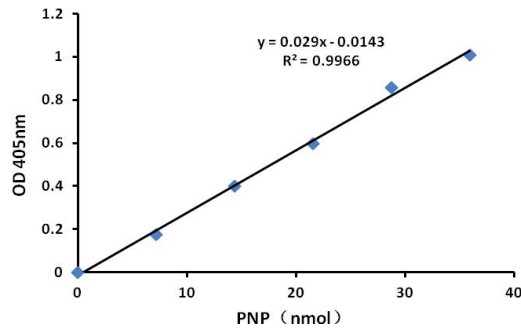
试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	40	
蒸馏水		40
试剂二	50	50
迅速混匀, 37℃ 保温 30min		

试剂三	300	300
混匀，取 200 $\mu$ L 至 96 孔板中，405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A - A$ 测定 -A 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 $^{\circ}$ C 保温反应时间（如 1 小时），或者增加样本上样量 V1（如增至 30 $\mu$ 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、标准曲线方程： $y = 0.029x - 0.0143$ ；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。

$\alpha$ -GC 活性(nmol/min/mg prot)=[ $(\Delta A + 0.0143) \div 0.029$ ] $\div (V1 \times Cpr) \div T = 114.9 \times (\Delta A + 0.0143) \div Cpr$

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。

$\alpha$ -GC 活性(nmol/min/g 鲜重)=[ $(\Delta A + 0.0143) \div 0.029$ ] $\div (W \times V1 \div V) \div T = 114.9 \times (\Delta A + 0.0143) \div W$

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）定义为一个酶活性单位。

$\alpha$ -GC 活性(nmol/min/ $10^4$ cell)=[ $(\Delta A + 0.0143) \div 0.029$ ] $\div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.23 \times (\Delta A + 0.0143)$

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。

$\alpha$ -GC 活性(nmol/min/mL)=[ $(\Delta A + 0.0143) \div 0.029$ ] $\div V1 \div T = 114.9 \times (\Delta A + 0.0143)$

V----加入提取液体积，1mL；

V1----加入反应体系中样本体积，10 $\mu$ L=0.01mL；

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 管加入：10 $\mu$ L 标准品+40 $\mu$ L 蒸馏水+50 $\mu$ L 试剂二+300 $\mu$ L 试剂三，混匀，取 200 $\mu$ L 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。