

葡萄糖脱氢酶 (Glucose dehydrogenase, GCDH) 试剂盒说明书 (微板法 96 样)

一、产品简介:

GCDH (EC 1.1.1.47) 属于氧化还原酶家族, 催化 D-葡萄糖和 NAD(P) 生成 D-葡萄糖酸和 NAD(P)H, 参与戊糖磷酸途径。GCDH 催化 D-葡萄糖和 NAD 生成 D-葡萄糖酸和 NADH, 在 340nm 下测定 NADH 上升速率, 即可反映 GCDH 活性。传统方法是检测 NADH 在 340nm 处的吸光值。由于 NADH 的摩尔消光系数 (ϵ) 较低, 所以这种方法灵敏度低, 且严重受到干扰。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法: 该酶促过程产生的 NADH 与特异的显色剂反应, 产生在 450nm 处有最大吸收峰的可有物质, 通过检测该有色物质在 450nm 的增加速率, 进而计算出葡萄糖脱氢酶活性的大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前加入 19mL 试剂一充分溶解, 用不完的试剂仍 4℃ 保存。
试剂三	液体 1.1ml×EP 管	4℃ 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	-20℃ 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、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、葡萄糖脱氢酶 (GCDH) 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:

建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可以按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取。

② 细菌/培养细胞:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 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); 12000rpm, 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。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。

② 试剂放在 37℃ 水浴 5min;

③ 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂:

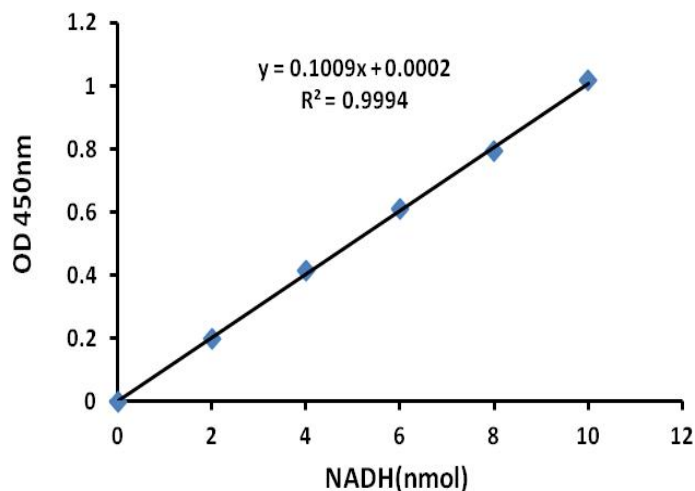
试剂名称 (μ L)	测定管
样本	10
试剂二	180
试剂三	10
混匀, 立即 450nm 下读取 A1 值, 20min 后读取 A2 值, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】: 若 ΔA 过小, 可以延长反应时间 (如: 30min 或更长), 重新调整的反应时间值要代入计算公式重

新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.1009x + 0.0002$ ；x 是 NADH 摩尔质量：nmol,y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化 1 nmolNAD⁺生成 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCDH (nmol/min /mg prot)} = [(\Delta A - 0.0002) \div 0.1009] \div (V1 \times Cpr) \div T = 49.6 \times (\Delta A - 0.0002) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算

单位定义：每克组织每分钟催化 1 nmolNAD⁺生成 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCDH (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0002) \div 0.1009] \div (W \times V1 \div V) \div T = 49.6 \times (\Delta A - 0.0002) \div W$$

4、按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.0002) \div 0.1009] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.1 \times (\Delta A - 0.0002)$$

V----加入提取液体积，1 mL；

V1----加入样本体积，0.01 mL；

T----反应时间，20 min；

Cpr----样本蛋白质浓度，mg/mL；

W----样本质量，g；

500----细菌或细胞总数，500 万。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1nmol/ μ L）：向标准品 EP 管里面加入 1.41ml 蒸馏水（母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol / μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。