

α -葡萄糖苷酶(α -GC)活性检测试剂盒说明书

α -glucosidase Assay Kit

微量法

货号: AK036

规格: 100T /48S

产品组成及保存条件:

名称	规格	储存条件
提取液 ES02	液体 100mL×1 瓶	4℃保存
AK036-A	粉剂×2 瓶	-20℃保存; 临用前取 1 瓶加入 6mL 蒸馏水, 充分溶解备用; 用不完的试剂-20℃分装保存 4 周, 避免反复冻融。
AK036-B	液体 15mL×1 瓶	4℃保存
AK036-C	液体 15mL×1 瓶	4℃保存
AK036-标准品 (5 μ mol/mL)	液体 1mL×1 支	4℃保存

简介:

意义: 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。

原理: 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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液 ES02 体积(mL)为 500~1000:1 的比例(建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES02), 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); 15000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 组织: 按照组织质量(g): 提取液 ES02 体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 ES02), 进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 400nm, 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 200、150、100、50、25、12.5、0 nmol/mL 标准溶液待测。
3. 样本测定(在 EP 管中依次加入下列试剂):

试剂名称	测定管(ul)	对照管(ul)	标准管(ul)
AK036-A	100		
AK036-B	150	150	
样本	30	30	
充分混匀, 37℃准确水浴 30min 后, 立即放入 95℃水浴 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)			
AK036-A		30	
充分混匀, 8000g, 4°C, 离心 5min, 取上清液待测			
上清液	70	70	
标准品			70
AK036-C	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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。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。			

α -GC 活力计算:

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

(1) 按样本蛋白浓度计算:

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

$$\alpha\text{-GC 活力 (U/mg prot)} = (x \times V_{\text{反总}}) \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 18.67x \div \text{Cpr}$$

蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))。

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每g 组织每小时产生1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-GC 活力 (U/g 鲜重)} = (x \times V_{\text{反总}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 18.67x \div W$$

(3) 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。

$$\alpha\text{-GC 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = (x \times V_{\text{反总}}) \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.0374x$$

注: Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.28mL; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.03mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; W: 样品质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; T: 反应时间, 0.5h。