

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:

	规格	储存条件
提取液 ES02	液体 100mL×1 瓶	4℃保存
AK036-A	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 临用前每瓶加入 12mL 蒸馏水, 充分溶解备用; 用不完的 试剂仍-20℃保存。
AK036-B	液体 15mL×1 瓶	4℃保存
AK036-C	液体 15mL×1 瓶	4℃保存

- 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

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, 催化水解芳基或羟基与糖基之间的 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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、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. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 400nm, 蒸馏水调零。
2. 样本测定 (在 EP 管或 96 孔板中依次加入下列试剂):

试剂名称(ul)	测定管	对照管
AK036-A	120	
AK036-B	150	150
样本	30	30
充分混匀, 放入 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		120
充分混匀, 8000g, 4℃, 离心 5min, 取上清液		

上清液	70	70
AK036-C	130	130

充分混匀，室温静置 2min 后，400nm 处测定吸光值 A，计算 $\Delta A = A$ 测定管-A 对照管。
每个测定管需设一个对照管。

α -GC 活力计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.32x - 0.0027$ ；x 为标准品浓度 (nmol/mL)，y 为吸光值。

(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。

$$\alpha\text{-GC 活力 (nmol/h/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.32 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 62.5 \times (\Delta A + 0.0027) \div Cpr$$

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。

$$\alpha\text{-GC 活力 (nmol/h/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.32 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 62.5 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(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。

$$\alpha\text{-GC 活力 (nmol/h/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.32 \times V \text{ 反总}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 0.125 \times (\Delta A + 0.0027)$$

注： Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.3mL; 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; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; T: 反应时间, 0.5h。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下：

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.16x - 0.0027$ ；x 为标准品浓度 (nmol/mL)，y 为吸光值。

(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。

$$\alpha\text{-GC 活力 (nmol/h/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.16 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 125 \times (\Delta A + 0.0027) \div Cpr$$

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。

$$\alpha\text{-GC 活力 (nmol/h/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.16 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 125 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(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。

$$\alpha\text{-GC 活力 (nmol/h/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.16 \times V \text{ 反总}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 0.25 \times (\Delta A + 0.0027)$$

注： Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.3mL; 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; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; T: 反应时间, 0.5h。