北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

# α-葡萄糖苷酶（α-GC）活性检测试剂盒说明书

**可见分光光度法**

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

**货号：** D17143

**规格：** 50T/24S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 |
|---|---|---|
| 提取液 | 液体 50 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂一 | 粉剂×2 瓶 | -20℃保存 |
| 试剂二 | 液体 25 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂三 | 液体 80 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 标准品 | 液体 1 mL×1 支 | 2-8℃保存 |

溶液的配制：

1、试剂一：临用前取 1 瓶加入 10 mL 蒸馏水， 充分溶解备用；用不完的试剂-20℃保存 4 周，避免反复冻融。

2 、标准品：5 μmol/mL 的对硝基苯酚溶液。

**产品说明：**

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。

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。

p-Nitrophenyl α-D-Glucopyranoside $\xrightarrow{\text{α-GC}}$ p-Nitrophenol(400nm)

**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、超声破碎仪、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

**产品说明：**

**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

1、细菌或培养细胞的处理：收集细菌或细胞到离心管内， 离心后弃上清；按照每 1000 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 200W，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次），15000g，4℃，离心 20min，取上清，置冰上待测。

2、组织的处理： 称取约 0.2g 组织， 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆； 15000g，4℃，离心 20min，取上清，置冰上待测。

3 、液体样本： 直接检测。若溶液有浑浊需离心后取上清进行测定。

**二、测定步骤**

1 、 分光光度计预热30min以上，调节波长400nm，蒸馏水调零。

2、 标准溶液的稀释：将 5μmol/mL 的标准液用蒸馏水稀释成 100、50、25、12.5、6.25、0 nmol/mL 标准溶液待测。

3、 标准液稀释可参考下表：

| 序号 | 稀释前浓度(nmol/mL) | 标准液体积(μL) | 蒸馏水体积(μL) | 稀释后浓度(nmol/mL) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 5000 | 100 | 400 | 1000 |
| 2 | 1000 | 200 | 1800 | 100 |
| 3 | 100 | 1000 | 1000 | 50 |
| 4 | 50 | 1000 | 1000 | 25 |
| 5 | 25 | 1000 | 1000 | 12.5 |
| 6 | 12.5 | 1000 | 1000 | 6.25 |
| 7 | 6.25 | 0 | 1000 | 0（空白管） |

备注： 实验中每个标准管需 500μL 标准溶液。

4、 加样表

| 试剂名称(μL) | 测定管 | 对照管 | 标准管 |
|---|---|---|---|
| 试剂一 | 400 | | |
| 试剂二 | 500 | 500 | |
| 样本 | 100 | 100 | |
| 充分混匀，放入37℃水浴锅/恒温培养箱中准确反应30min后， 立即放入沸水浴中煮沸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) | | | |
| 试剂一 | | 400 | |
| 充分混匀， 8000g，4℃，离心5min，取上清液待测 | | | |
| 上清液 | 500 | 500 | |
| 标准液 | | | 500 |
| 试剂三 | 1000 | 1000 | 1000 |
| 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 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管。 ΔA 标准=A 标准管-A 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。 | | | |

## 三、 α-GC活力计算

1、标准曲线建立：

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

2、α-GC活力计算

（1） 按样本蛋白浓度计算：

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

α-GC活力(U/mg prot）=（x×V反总）÷（V样×Cpr）÷T=20x÷Cpr

（2） 按样本质量计算：

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

α-GC活力(U/g 质量）=（x×V反总）÷（W×V样÷V样总）÷T=20x÷W

（3）按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每1万个细菌或细胞在每mL体系中每小时产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

α- GC活力(U/$10^4$ cell）=（x×V反总）÷（1000×V样÷V样总）÷T=0.02x

Cpr：样本蛋白质浓度， mg/mL，蛋白浓度需要另外测定；V反总： 反应体系总体积， 1mL；V样：加入反应体系中样本体积，0.1mL；V样总： 加入提取液体积， 1mL；W：样本质量， g；1000：细胞或细菌总数， 1000万；T：反应时间，0.5h。

**产品说明：**

提取液中含有使蛋白变性的成分，故按蛋白浓度计算时需要重新提取蛋白进行测定。