

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

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

GCDH (EC 1.1.1.47) 催化 D-葡萄糖和 NAD(P) 生成 D-葡萄糖酸和 NAD(P)H, 大量存在于高等动物的肝脏和弱氧化醋杆菌中。在低聚果糖生产中使用 GCDH, 不仅能去除低聚果糖中的葡萄糖提高低聚果糖的含量, 而且生成的葡萄糖酸与钙离子结合生成的葡萄糖酸钙是一种理想的补钙制剂。因而, GCDH 已成为制备高含量低聚果糖的理想用酶。

测定原理:

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。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 60mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 47.5 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存;

样本的前处理:

组织的前处理: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

细菌或培养细胞的前处理: 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), 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); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零;
- 2、工作液的配制: 临用前将试剂二转移到试剂一中混合溶解待用; 用不完的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融。
- 3、将工作液置于 37℃ 预热 5 分钟。
- 4、在 1mL 石英比色皿中加入 50 μ L 样本和 950 μ L 工作液, 立即混匀, 记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

GCDH 活性计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义: 每 mg 组织蛋白每分钟生成 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCDH (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCDH (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{GCDH (nmol/min /} 10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.05 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 1 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。