

**$\alpha$ -葡萄糖苷酶 ( $\alpha$ -Glucosidase,  $\alpha$ -GC) 试剂盒说明书****微量法 100 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:**

$\alpha$ -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  $\alpha$ -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。

**测定原理:**

$\alpha$ -GC 分解对-硝基苯- $\alpha$ -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  $\alpha$ -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。

**试剂组成和配制:**

提取液:液体 100mL $\times$ 1 瓶,4 $^{\circ}$ C 保存。

试剂一:粉剂 $\times$ 1 瓶,-20 $^{\circ}$ C 保存;临用前加入 12mL 蒸馏水,充分溶解备用;用不完的试剂仍-20 $^{\circ}$ C 保存。

试剂二:液体 15mL $\times$ 1 瓶,4 $^{\circ}$ C 保存。

试剂三:液体 15mL $\times$ 1 瓶,4 $^{\circ}$ C 保存。

**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);15000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min,取上清,置冰上待测。

2、组织: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。15000g 4 $^{\circ}$ C 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、加样表**

试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管	对照管
试剂一	120	
蒸馏水		120
试剂二	150	150
样本	30	30

充分混匀,放入 37 $^{\circ}$ C 准确水浴 30min 后,立即放入 95 $^{\circ}$ C 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),8000g,4 $^{\circ}$ C,离心 5min,取上清液(在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂)

上清液	70	70
试剂三	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  $y = 0.00585x - 0.0027$ ；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 组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T$$

$$= 56.98 \times (\Delta A + 0.0027) \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 56.98 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V \text{ 反总}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 0.114 \times (\Delta A + 0.0027)$$

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；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万；T：反应时间，30min。

**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  $y = 0.0039x - 0.0027$ ；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 组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T$$

$$= 85.47 \times (\Delta A + 0.0027) \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 85.47 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V \text{ 反总}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 0.171 \times (\Delta A + 0.0027)$$

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；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万；T：反应时间，30min。