

**$\alpha$ -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×1瓶，4°C保存。

试剂一：粉剂×1瓶，-20°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°C保存。

试剂二：液体15mL×1瓶，4°C保存。

试剂三：液体15mL×1瓶，4°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<sup>4</sup>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°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°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 (μL)	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°C准确水浴30min后，立即放入95°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°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 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

每个测定管需设一个对照管。

$\alpha$ -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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-GC活性}(\text{nmol/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 56.98 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-GC活性}(\text{nmol/min/g鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 56.98 \times (\Delta A + 0.0027) \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-GC活性}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.114 \times (\Delta A + 0.0027) \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-GC活性}(\text{nmol/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 85.47 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

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

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

(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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-GC活性}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.171 \times (\Delta A + 0.0027) \end{aligned}$$

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。