

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

微量法 100管/96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/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体19 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（10⁴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. 分光光度计或酶标仪预热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4℃可保存一周；
3. 将工作液置于37℃预热5分钟。
4. 在1mL石英比色皿中加入10μL样本和190μL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：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

(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。

$$\text{GCDH (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} 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, 0.01 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。

b.用96孔板测定的计算公式如下:

(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。

$$\text{GCDH (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 6430 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{GCDH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6430 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{GCDH (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 12.86 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol /cm; d: 96孔板光径, 0.05cm; V样: 加入样本体积, 0.01 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。