

α -葡萄糖苷酶 (α -GC) 活性检测试剂盒说明书

微量法

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：BC2555

规格：100T/48S

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 100 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	粉剂×2 瓶	-20°C保存
试剂二	液体 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8°C保存

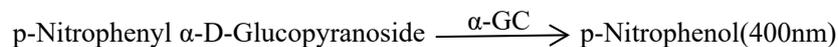
溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前取 1 瓶加入 6 mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂建议-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、标准品：5 μ mol/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。



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/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、超声破碎仪、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

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°C，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°C，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、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至400nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、标准溶液的稀释 将 5 μ mol/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 (μ L)	蒸馏水体积 (μ L)	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 70 μ L 标准溶液。

4、加样表

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管	标准管
试剂一	100		
试剂二	150	150	
样本	30	30	
充分混匀，放入37 $^{\circ}$ C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		100	
充分混匀，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	
标准液			70
试剂三	130	130	130
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。

$$GC \text{活力} (U/mg \text{ prot}) = (x \times V_{\text{反总}}) \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 18.67x \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$GC \text{活力} (U/g \text{ 质量}) = (x \times V_{\text{反总}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 18.67x \div W$$

(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。

$$\text{GC活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = (\text{x} \times \text{V反总}) \div (\text{1000} \times \text{V样} \div \text{V样总}) \div \text{T} = 0.0187\text{x}$$

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, 0.28mL; 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; W: 样本质量, g; 1000: 细胞或细菌总数, 1000万; T: 反应时间, 0.5h。

注意事项:

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。

参考文献:

[1] Wang S Y, Camp M J, Ehlenfeldt M K. Antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars[J]. Food Chemistry, 2012, 132(4): 1759-1768.

相关系列产品:

BC0340/BC0345 糖原含量检测试剂盒

BC0360/BC0365 β -1,3葡聚糖酶 (β -1,3-GA) 活性检测试剂盒

BC2510/BC2515 海藻糖酶 (THL) 活性检测试剂盒

