

# 葡萄糖脱氢酶（GCDH）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号：AC10487

规格：50T/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，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×2 瓶	-20°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 15 mL 试剂一溶解，用不完的试剂 4°C保存；
- 2、试剂三：临用前每瓶加入 5 mL 试剂一溶解，用不完的试剂建议分装后-20°C避光保存，避免反复冻融；
- 3、工作液的配制：按照试剂一：试剂二：试剂三为 4：3：2 的体积比例充分混匀，现用现配，用前 37°C 预热 10 min。

## 产品说明：

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，主要存在于多种微生物和高等动物的肝脏中。GCDH是一种制备高含量低聚果糖的理想用酶，同时也是临床血糖测定的诊断用酶，可广泛用于食品工业及医药工业领域中。

GCDH催化D-葡萄糖和NAD生成D-葡萄糖酸和NADH，利用NADH在340nm处吸光值的变化即可反映葡萄糖脱氢酶的活性。

**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：

紫外分光光度计、台式低温离心机、水浴锅、1 mL 石英比色皿、可调式移液枪、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）

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，然后，8000g，4°C，离心10 min，取上清置于冰上待测。

细胞或细菌：先收集细胞或细菌到离心管内，离心后弃上清；按照细胞数量（10<sup>4</sup>个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万个细胞或细菌加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞或细菌（功率20%或200 W，超声3s，间隔7s，总时间5min）；然后8000g，4°C，离心10min，取上清置于冰上待测。

血浆（清）：直接检测。

### 二、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、操作表（在 1 mL 石英比色皿中分别加入下列试剂）：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	空白管	测定管
工作液	900	900
样本		100
蒸馏水	100	
加入样本即开始计时，立即混匀，于 340nm 处测定 10s 时的吸光值 A1，迅速置于 37°C 水浴或培养箱 1min，拿出迅速擦干测定 1min 10s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A$ 测定管=A2 测定-A1 测定， $\Delta A$ 空白管=A2 空白-A1 空白， $\Delta A=\Delta A$ 测定管- $\Delta A$ 空白管（空白管只需做 1-2 次）。		

### 三、GCDH 酶活计算

1、按样本蛋白浓度计算

酶活定义：每毫克蛋白每分钟产生 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCDH 酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1607.7 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本质量计算

酶活定义：每克样本每分钟产生 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCDH 酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 1607.7 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌和细胞数量计算

酶活定义：每  $10^4$  个细胞每分钟产生 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GCDH 酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T \\ &= 1607.7 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

4、按液体体积计算

酶活定义：每 mL 样本每分钟产生 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCDH 酶活 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 1607.7 \times \Delta A$$

$\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径,  $1\text{cm}$ ;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ ;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $1 \times 10^{-3}\text{L}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 反应体系中样本体积,  $0.1\text{mL}$ ;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积,  $1\text{mL}$ ;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $W$ : 样本质量,  $\text{g}$ ;  $T$ : 反应时间,  $1\text{min}$ 。

#### 注意事项：

- 1、样本提取上清液置于冰上待测，且样本提取完成后建议当天提取当天内测完。
- 2、当 A1 或 A2 大于 1 时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定。
- 3、当  $\Delta A$  大于 1 时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定。

#### 实验实例：

- 1、取 0.1g 肝脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，测得计算  $\Delta A$  测定管=A2 测定-A1 测定=0.726-0.682=0.044,  $\Delta A$  空白管=A2 空白-A1 空白=0.031-0.031=0,  $\Delta A=\Delta A$  测定管- $\Delta A$  空白管=0.044-0=0.044, 按样本质量计算酶活得：

$$\text{GCDH 酶活 (U/g 质量)} = 1607.7 \times \Delta A \div W = 1607.7 \times 0.044 \div 0.1 = 707.388 \text{U/g 质量}。$$