

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

(G0812W 微板法 96 样)

一、产品简介：

GCDH (EC 1.1.1.47) 属于氧化还原酶家族，催化 D-葡萄糖和 NAD(P) 生成 D-葡萄糖酸和 NAD(P)H，参与戊糖磷酸途径。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。传统方法是检测 NADH 在 340nm 处的吸光值。由于 NADH 的摩尔消光系数 (ϵ) 较低，所以这种方法灵敏度低，且严重受到干扰。

本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法：该酶促过程产生的 NADH 与特异的显色剂反应，产生在 450nm 处有最大吸收峰的可有物质，通过检测该有色物质在 450nm 的增加速率，进而计算出葡萄糖脱氢酶活性的大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前加入 19mL 试剂一充分溶解，用不完的试剂仍 4℃ 保存。
试剂三	液体 1.1mL×EP 管	4℃ 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、葡萄糖脱氢酶 (GCDH) 活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备

① 组织样本：

建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可以按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取。

② 细菌/培养细胞：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 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）；12000rpm, 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

② 试剂放在 37℃ 水浴 5min；

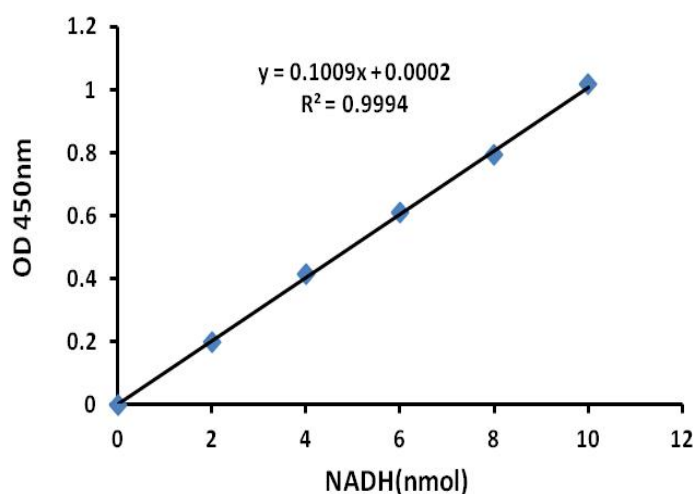
③ 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂：

试剂名称 (μ L)	测定管
样本	10
试剂二	180
试剂三	10
混匀，立即 450nm 下读取 A1 值，20min 后读取 A2 值， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：若 ΔA 过小，可以延长反应时间（如：30min 或更长），重新调整的反应时间值要代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.1009x + 0.0002$ ； x 是 NADH 摩尔质量： nmol, y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化 1 nmolNAD⁺生成 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCDH (nmol/min /mg prot)} = [(\Delta A - 0.0002) \div 0.1009] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 49.6 \times (\Delta A - 0.0002) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算

单位定义：每克组织每分钟催化 1 nmolNAD⁺生成 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCDH (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0002) \div 0.1009] \div (W \times V1 \div V) \div T = 49.6 \times (\Delta A - 0.0002) \div W$$

4、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。

$$\text{GCDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.0002) \div 0.1009] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.1 \times (\Delta A - 0.0002)$$

V----加入提取液体积，1 mL；

V1----加入样本体积，0.01 mL；

T----反应时间，20 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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1nmol/ μL ）：向标准品 EP 管里面加入 1.41ml 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol / μL 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。