

## 葡萄糖脱氢酶（Glucose dehydrogenase, GCDH）试剂盒说明书 （分光法 48 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 ( $\epsilon$ ) 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 处有最大吸收峰的有色物质，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 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前加入 38mL 试剂一充分溶解，用不完的试剂仍 4℃ 保存。
试剂三	液体 2.1ml×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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、台式离心机、可调式移液器、研钵

### 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：

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/细胞

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 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 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

② 试剂放在 37℃ 水浴 5min；

③ 在 1mL 玻璃比色皿中按照下表依次加入试剂：

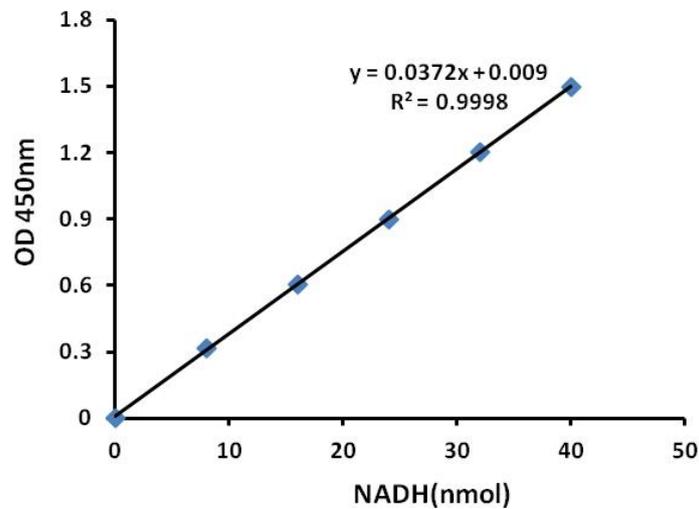
试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管
样本	40
试剂二	720
试剂三	40
混匀，立即 450nm 下读取 A1 值，20min 后读取 A2 值， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

**【注】：**若  $\Delta A$  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： $y = 0.0372x + 0.009$ ；x 是 NADH 摩尔质量：nmol，y 是  $\Delta A$ 。



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<sup>+</sup>生成 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCDH (nmol/min /mg prot)} = [(\Delta A - 0.009) \div 0.0372] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 33.6 \times (\Delta A - 0.009) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算

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

$$\text{GCDH (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.009) \div 0.0372] \div (W \times V1 \div V) \div T = 33.6 \times (\Delta A - 0.009) \div W$$

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。

$$\text{GCDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.009) \div 0.0372] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.07 \times (\Delta A - 0.009)$$

V----加入提取液体积，1 mL；

V1----加入样本体积，0.04 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/ $\mu\text{L}$ ）：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 $^{\circ}\text{C}$ 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 / $\mu\text{L}$ 。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。