

α-葡萄糖苷酶抑制筛选检测试剂盒说明书

规格：微量法 96样

检测波长：400nm

编号：JLC_K14811

线性范围：10%-80%

注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定。

测定意义

α-葡萄糖苷酶α-GC(EC 3.2.1.20)是一种重要的糖苷水解酶，广泛存在于动植物及微生物中，主要用于催化α-葡萄糖苷键的水解，释放葡萄糖，具有重要的生物学和工业应用。因此开发α-GC抑制剂在治疗糖尿病相关研究、天然产物开发、药物发现和基础酶学研究领域扮演着至关重要的角色。

测定原理

α-葡萄糖苷酶催化底物反应生成有色产物，其在400 nm 处吸光度上升，加入抑制剂后会抑制α-葡萄糖苷酶酶活，吸光度上升的速率会降低，根据吸光度差值可计算出抑制率。

需自备的仪器和用品

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制

试剂名称	规格	数目	贮藏	备注
试剂一	液体120mL	x1	4°C	
试剂二	液体3.5mL	x1	-20°C	避免反复冻融
试剂三	液体1mL	x1	-20°C,避光	5mmol/L测定抑制率可作为参考IC50 约为0.1μmol/L
试剂四	液体3.3mL	x1	-20°C,避光	临用前加12ml水溶解，避免反复冻融

样品处理

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：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）：试剂一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL试剂一），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。

组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL试剂一），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、液体样品：直接检测。

操作步骤

1. 酶标仪预热30min以上，调节波长至400nm

2. 试剂二置于冰盒上待用。阳性对照孔测定的为 α -GC特异性抑制剂阿卡波糖的抑制率，仅可作为参考，实际测定过程中可选做孔，在本试剂盒中的IC₅₀约在0.1 μ mol/L，实测数据会有差异。

3. 在96孔板中依次加入：

	总酶活孔(只做一孔)	阳性对照孔(选做)	测定孔
试剂一	150	120	120
试剂二	30	30	30
试剂三	-	30	-
样本	-	-	30
试剂四	30	30	30
酶标仪400nm处测定吸光值A ₁ ，37℃孵育10min后测定吸光值A ₂ Δ A=A ₂ -A ₁			

α -葡萄糖苷酶活性抑制率计算：

1. 抑制率计算公式：

抑制率(%)=(Δ A_总- Δ A_测) \div Δ A_总 \times 100%

Δ A_总：总酶活孔OD值；

Δ A_测：测定孔 OD 值；

备注：抑制率在 10%-80%区间内呈线性，超过 80%，抑制率曲线会渐趋平缓，如果需要在线性范围内测定抑制率，需要提前做预实验，选取合适的稀释倍数或样本量

2. IC₅₀ 计算：

IC₅₀，即抑制剂半抑制浓度。对于确定对 α -葡萄糖苷酶有抑制作用的样本，可配制成适当的浓度梯度，分别以样本浓度为横坐标，以抑制率为纵坐标做标准曲线，以此计算得到抑制率为 50%时的样本浓度，即 IC₅₀。

预实验的意义

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3 - 5组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。