

## AGH 检测方法

( $\alpha$ -Glucosidase)  
S10050

### 1 原理

p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNPG)  $\xrightarrow{\alpha\text{-glucosidase}}$  p-Nitrophenol (PNP) +  $\alpha$ -D-Glucose

PNPG 的出现可以通过 400nm 的光吸收进行检测。

### 2 试剂:

A: 100mM Phosphate buffer pH7.0

B: 20mM PNPG solution

C: 0.2MNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

D: 酶稀释液 0.2M K-phosphate buffer, pH 7.0 containing 1mM of EDTA and 0.05% of Tween 20

### 3 操作规程:

#### 3.1 样品准备

若待测样品为固体, 按 10mg 样品/1000  $\mu$ L 超纯水比例溶解。溶解后于 2-8 度放置 30min。

#### 3.2 检测方法

3.2.1 1.0ml A+ 0.5ml B, 温和混匀, 在 37°C 温浴 5min。

3.2.2 加入 0.5ml 样品, 温和混匀。

3.2.3 在 37°C 温浴 15min 后, 加入 2.0ml C 去终止反应, 在 400nm 波长检测吸光值 (OD<sub>test</sub>)。

3.2.4 活性值 (U/ml) 范围为 0.006-0.022U/ml, 若超出范围, 待测样品需经试剂 D 稀释后再次进行检测。

3.2.5 测定样品前需检测空白反应值, 其他操作不变, 用 D 代替样品加入 后进行反应, 测定 OD blank。

#### 3.2.6 计算公式

$$\text{活性 (U/ml)} = \frac{\Delta \text{OD} (\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_{\text{blank}}) \times V_t \times df}{18.1 \times t \times 1.0 \times V_s}$$

$$= \Delta \text{OD} \times 0.0295 \times df$$

V<sub>t</sub>: 样品反应液的总体积; (1+0.5+0.5+2=4)

D<sub>f</sub>: 稀释因子 (未被稀释, 为1)

18.1: 对硝基苯酚在 400 nm 处的毫摩尔消光系数

t: 测定时间 (分钟) (15min)

1.0: 1.0mmol/l 产物的量

V<sub>s</sub>: 比色测定中使用的反应样品体积 (毫升) (0.5ml)