

## 葡萄糖脱氢酶活性检测试剂盒 (50T)

### 一般说明

葡萄糖脱氢酶 (GDH) 属于氧化还原酶家族, 催化D-葡萄糖+NAD (P) D-葡萄糖酸 (的内酯) +NAD (P) H的反应。来源于动物的酶 (EC. 1. 1. 1. 47) 既能利用NAD, 也能利用NADP。本公司的GDH检测是基于四唑盐MTT在NADH偶联的酶促反应中被还原成MTT的还原形式, 在565 nm处显示出吸收最大值。在565 nm处的吸光度与酶的活性成正比。检测范围: 0.5至200 U/L。

### 适用性

测定各种生物样品 (如血浆、血清、尿液、组织等) 中的 GDH 活性。

### 试剂盒组成(96孔板供100份检测)

缓冲液	6 mL	心肌黄酶	60 $\mu$ L
NAD/MTT:	0.5 mL	校准液	1 mL
底物	1 mL		

储存: 所有试剂均在 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

### 检测步骤

这种测定是以动力学反应为基础的。为确保相同的孵化时间, 向样品中加入反应试剂的速度要快, 混合时间要短但要彻底。建议使用多通道移液器。检测可以在任何需要的温度下进行 (如 $25^{\circ}\text{C}$ 或 $37^{\circ}\text{C}$ )。

#### 一、样本制备:

血清和血浆直接进行检测。

组织: 在解剖前, 用磷酸盐缓冲盐水 (pH7.4) 冲洗组织以去除血液。在含有 50mM 磷酸二氢钾 (pH7.5) 的约 200 $\mu$ L 缓冲液中匀浆组织 (50mg)。在  $4^{\circ}\text{C}$  下以 10,000x g 离心 15 分钟。取上清液进行检测。

细胞裂解液: 在  $4^{\circ}\text{C}$  下以 2,000 x g 离心 5 分钟, 收集细胞。对于粘附细胞, 不要用蛋白水解酶来收获细胞, 而是用刮除器。在含有 50mM 磷酸二氢钾 (pH7.5) 的适当体积的冷缓冲液中匀浆或超声处理细胞。在  $4^{\circ}\text{C}$  下以 10,000 x g 离心 15 分钟。取上清液进行检测。

所有样品可在 $-20^{\circ}\text{C}$ 至 $-80^{\circ}\text{C}$ 下储存至少一个月。

#### 二、试剂准备:

将试剂平衡到所需的反应温度 (如  $25^{\circ}\text{C}$  或  $37^{\circ}\text{C}$ )。在使用前对试剂进行简单的离心。

准备足够的反应试剂, 每份检测混合如下: 8  $\mu$ L 底物, 8  $\mu$ L NAD/MTT, 1  $\mu$ L 心肌黄酶 和 70  $\mu$ L 缓冲液。

#### 三、反应:

1. 将100 $\mu$ L 水 ( $\text{OD}_{\text{H}_2\text{O}}$ ) 和100 $\mu$ L 校准液 ( $\text{OD}_{\text{CAL}}$ ) 溶液转移到透明平底96孔板的孔中。
2. 按每个样品20 $\mu$ L的量转移到不同的孔中, 然后在每个样品孔中加入80 $\mu$ L反应试剂。短暂敲击孔板以混合。
3. 在酶标仪上读取  $\text{OD}_{565\text{nm}}$  ( $\text{OD}_0$ ), 并在 15 分钟后再次读取 ( $\text{OD}_{15}$ )。



#### 四、计算

从每个样品的OD<sub>15</sub>中减去OD<sub>0</sub>来计算ΔOD<sub>S</sub>值。然后，GDH活性可按以下方式计算：

$$\begin{aligned}\text{GDH Activity} &= \frac{\Delta\text{OD}_S}{\epsilon_{\text{mtt}} \times l} \times \frac{\text{Reaction Vol } (\mu\text{L})}{t \text{ (min)} \times \text{Sample Vol } (\mu\text{L})} \times n \\ &= \frac{\Delta\text{OD}_S}{\text{OD}_{\text{CAL}} - \text{OD}_{\text{H}_2\text{O}}} \times \frac{273}{t \text{ (min)}} \times n \quad (\text{U/L})\end{aligned}$$

其中  $\epsilon_{\text{mtt}}$  是还原MTT的摩尔吸收系数。l是光的路径长度，由校准器计算得出。OD<sub>CAL</sub>和OD<sub>H<sub>2</sub>O</sub>是校准液和水的OD<sub>565nm</sub> (OD<sub>0</sub>) 值。t是反应时间（建议时间为30分钟）。反应体积和样品体积分别为100μL和20μL，n是稀释系数。

**备注：**如果样品GDH活性超过80 U/L，可以使用较短的反应时间，或者将样品在水中稀释并重复检测。对于GDH活性<1 U/L的样品，孵化时间可延长至2小时。

**注意事项：**本产品仅供研究用，使用过程中应严格遵循实验安全措施。

