

葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase, GOD) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

GOD (EC 1.1.3.4) 广泛存在于动物、和植物中，催化葡萄糖氧化生成葡萄糖酸，并产生 H₂O₂，是生物体中产生活性氧的代谢途径之一。

测定原理：

GOD 催化产生 H₂O₂，过氧化物酶催化 H₂O₂ 氧化 4-氨基安替比林偶联酚，生成有色化合物，在 500 nm 有特征吸收峰，颜色深浅与 GOD 活性成线性关系。

组成：

产品名称	OX010-100T/48S	Storage
提取液：液体	100ml	4°C
缓冲液：液体	30ml	4°C
试剂一：粉剂	1 瓶	-20°C
试剂二：粉剂	1 瓶	-20°C
说明书	一份	

试剂一：粉剂×1 瓶，-20°C 保存；临用前加入 10ml 缓冲液充分溶解待用；用不完的试剂 4°C 保存一个月；
试剂二：粉剂×1 瓶，-20°C 保存；临用前加入 10ml 缓冲液充分溶解待用；用不完的试剂 4°C 保存一个月；

自备仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰、蒸馏水

样本的前处理：

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）：提取液体积（ml）为 500~1000：1 的比例（建议 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）；8000g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。



组织：按照组织质量 (g) : 提取液体积(ml)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1ml 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 500nm, 蒸馏水调零。
- 2、试剂一和试剂二的配制: 参见试剂的组成和配制。
- 3、煮沸样本的准备: 取 200μl 样本至新的 EP 管中, 95°C水浴 10min, 冷却至室温后, 8000g 4°C离心 10min, 取上清作为对照管的煮沸样本待测。
- 4、测定操作表

试剂 (μl)	对照管	测定管
样本		50
煮沸样本	50	
试剂一	75	75
试剂二	75	75

混匀, 35°C保温 15min 后, 于 500nm 波长处读取吸光度。ΔA=A 测定管-A 对照管。每个测定管需设一个对照管。

GOD 活力单位的计算:

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

回归方程为 $y = 2.8348x - 0.0169$; x 为 H₂O₂ 标准品浓度 (μmol/ml), y 为 ΔA。

1、血清 (浆) GOD 活力的计算

单位定义: 每 ml 血清 (浆) 每分钟催化产生 1nmol H₂O₂ 为一个酶活力单位。

$$\text{GOD (nmol/min/ml)} = (\Delta A + 0.0169) \div 2.8348 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 1000 = 58.8 \times (\Delta A + 0.0169)$$

2、细菌、细胞或组织 GOD 活力的计算

(1) 按蛋白浓度计算

单位定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol H₂O₂ 为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GOD (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0169) \div 2.8348 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 1000 \div T \\ &= 58.8 \times (\Delta A + 0.0169) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1nmol H₂O₂ 为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GOD (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0169) \div 2.8348 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \div T \\ &= 58.8 \times (\Delta A + 0.0169) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位定义: 每一万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol H₂O₂ 为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GOD (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0169) \div 2.8348 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \div T \\ &= 0.118 \times (\Delta A + 0.0169) \end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.125ml; V 样: 加入样本体积, 0.05ml; V 样总: 加入提取液体积, 1 ml; T: 反应时间, 15 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。



b.用 96 孔板测定的计算公式如下

回归方程为 $y = 1.4174x - 0.0169$; x 为 H_2O_2 标准品浓度 ($\mu\text{mol/ml}$), y 为 ΔA 。

1、血清 (浆) GOD 活力的计算

单位定义: 每 ml 血清 (浆) 每分钟催化产生 $1\text{nmol } H_2O_2$ 为一个酶活力单位。

$$\text{GOD (nmol/min/ml)} = (\Delta A + 0.0169) \div 1.4174 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 1000 = 118 \times (\Delta A + 0.0169)$$

2、细菌、细胞或组织 GOD 活力的计算

(1) 按蛋白浓度计算

单位定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 $1\text{nmol } H_2O_2$ 为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GOD (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0169) \div 1.4174 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 1000 \div T \\ &= 118 \times (\Delta A + 0.0169) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织每分钟催化产生 $1\text{nmol } H_2O_2$ 为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GOD (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0169) \div 1.4174 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \div T \\ &= 118 \times (\Delta A + 0.0169) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位定义: 每一万个细菌或细胞每分钟催化产生 $1\text{nmol } H_2O_2$ 为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GOD (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0169) \div 1.4174 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \div T \\ &= 0.235 \times (\Delta A + 0.0169) \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.125ml ; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05ml ; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1ml ; T : 反应时间, 15min ; C_{pr} : 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 。

