

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。

试验中所需的仪器和设备

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

试剂的组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存；

缓冲液：液体30mL×1瓶，4°C保存；

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；

样品测定的准备

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。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。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 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1nmol H_2O_2 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 H_2O_2 为一个酶活力单位。

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

$$= 58.8 \times (\Delta A + 0.0169) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

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

$$= 58.8 \times (\Delta A + 0.0169) \div W$$

(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 H_2O_2 为一个酶活力单位。

$$\text{GOD (nmol/min/104 cell)} = (\Delta A + 0.0169) \div 2.8348 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \div T$$

$$= 0.118 \times (\Delta A + 0.0169)$$

$V_{\text{反总}}$ ：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，1 mL； T ：反应时间，15 min； 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。

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1nmol 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1nmol H₂O₂为一个酶活力单位。

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

(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。

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

(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。

$$\text{GOD (nmol/min/104 cell)} = (\Delta A + 0.0169) \div 1.4174 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \div T \\ = 0.235 \times (\Delta A + 0.0169)$$

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。