

## 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  $H_2O_2$ , 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  $H_2O_2$ , 过氧化物酶催化  $H_2O_2$  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℃ 保存;

缓冲液: 液体 30mL×1 瓶, 4℃ 保存;

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

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存; 临用前加入 10mL 缓冲液充分溶解待用; 用不完的试剂 4℃ 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 ( $10^4$  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℃ 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℃ 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℃ 水浴 10min, 冷却至室温后, 8000g 4℃ 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  $H_2O_2$  标准品浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ ),  $y$  为  $\Delta A$ 。

##### 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。

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

###### (2) 按样本鲜重计算

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

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

###### (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  $H_2O_2$  为一个酶活力单位。

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

$V_{\text{反总}}$ : 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;  $\text{Cpr}$ : 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  $\Delta A$ 。

##### 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  $H_2O_2$  为一个酶活力单位。

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

###### (2) 按样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1nmol  $H_2O_2$  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 1nmol  $H_2O_2$  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 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。