

葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase, GOD) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰、蒸馏水

试剂的组成和配制

提取液: 液体 60mL×1 瓶, 4℃ 保存;

缓冲液: 液体 50mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存; 临用前加入 20mL 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 20mL 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 500 μ L 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 (μ L)	对照管	测定管
样本		250
煮沸样本	250	
试剂一	375	375
试剂二	375	375

混匀, 35℃ 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

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 2.8348x - 0.0169$; 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 $1\text{nmol } H_2O_2$ 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 $1\text{nmol } H_2O_2$ 为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算

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

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

(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 $1\text{nmol } H_2O_2$ 为一个酶活力单位。

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

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.625mL ; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.25mL ; $V_{\text{样总}}$: 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 。