葡萄糖氧化酶(GOD)活性检测试剂盒说明书

Glucose oxidase Assay Kit

分光光度法

货号: AK136

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES20	液体 60mL×1 瓶	4℃保存;
AK136-A	液体 40mL×1 瓶	4℃保存;
AK136-B	液体 8mL×1 瓶	4℃保存;
AK136-C	液体 2mL×1 瓶	-20℃保存; 可分装保存, 避免反复冻融

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 葡萄糖氧化酶 (Glucose oxidase, 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。

原理: 葡萄糖氧化酶催化产生 H₂O₂, 过氧化物酶在有氧存在时催化 H₂O₂ 分解产生的氧又将邻联茴香胺氧化生成有色物质, 颜色深浅与葡萄糖氧化酶活性成线性关系。

自备用品:

可见分光光度计、1ml 玻璃比色皿、水浴锅、离心机、研钵/匀浆器、可调式移液枪、冰和蒸馏水。

样品准备:

1. 组织样品的制备:

组织处理: 按照组织质量 (g): 提取液 ES20 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 ES20), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2. 血清 (浆): 直接检测。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 500nm, 蒸馏水调零;
2. 工作液的配制: 用前取 20ml AK136-A 和 4ml AK136-B 充分混匀, 现配现用;
3. 测定前将工作液和 AK136-C 在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上;
4. 在 1mL 玻璃比色皿中加入 870μL 工作液和 30μL AK136-C, 立即混匀并在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min; 然后再加入 100μL 样本, 加样本的同时开始计时, 记录 500nm 下 20s 吸光值 A₁ 和 2 小时 20s 后的吸光值 A₂, 并计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

GOD 活力单位的计算:

1. 血清 (浆) GOD 活力的计算

单位定义: 每 mL 血清 (浆) 每小时催化产生 1μmol 氧化型邻联茴香胺为一个酶活力单位。

$$\text{GOD (U/mL)} = \Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \div V \text{ 样} \div T = 0.667 \times \Delta A$$

2. 组织 GOD 活力的计算

(1) 按蛋白浓度计算

单位定义: 每 mg 组织蛋白每小时催化产生 1μmol 氧化型邻联茴香胺为一个酶活力单位。

$$\text{GOD (U/mg prot)} = \Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 0.667 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每小时催化产生 1 μ mol 氧化型邻联茴香胺为一个酶活力单位。

$$\text{GOD (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.667 \times \Delta A \div W$$

注： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，1mL； ϵ ：氧化型邻联茴香胺摩尔消光系数，7.5mL/ μ mol/cm； d ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.1 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； T ：反应时间，2h； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g。

注意事项：

1. 不同匀浆组织中 GOD 活力不一样，做正式实验之前请先进行预实验，若 $A_2 - A_1 > 1$ ，则说明组织活力太高，必须用提取液稀释成适当浓度匀浆上清液，使 $A_2 - A_1 < 1$ ；若出现 $A_1 > A_2$ 现象，请将样本用提取液稀释成适当浓度。
2. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性