

## 葡萄糖氧化酶（GOD）活性测定试剂盒说明书

（货号：BP10312W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

### 一、指标介绍：

葡萄糖氧化酶（GOD，EC 1.1.3.4）是一种常见于多种微生物中的氧化还原酶，葡萄糖氧化酶催化葡萄糖和氧反应生成葡萄糖酸和过氧化氢，过氧化氢和特异显色剂反应产生（粉）红色产物，该产物在510nm有最大吸收峰，进而得到葡萄糖氧化酶活性大小。

### 二、试剂盒组分与配制：

| 试剂组分 | 试剂规格         | 存放温度   | 注意事项                                                                    |
|------|--------------|--------|-------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 100mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                                                         |
| 试剂一  | 液体 6mL×1 瓶   | 4℃避光保存 |                                                                         |
| 试剂二  | 液体 10mL×1 瓶  | 4℃避光保存 |                                                                         |
| 试剂三  | 粉体 2 支       | 4℃保存   | 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 每支加 1.2mL 的蒸馏水溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 标准管  | 液体 1 支       | 4℃保存   |                                                                         |

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取：

##### ① 组织样本：

0.1g 组织样本（水分充足的样本建议取 0.2g 左右），加 1mL 的提取液冰浴匀浆，粗提液全部转移到 EP 管中，12000rpm，4℃离心 10min，上清液待测。

##### ② 细胞/细菌样本：

先收集细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细胞/细菌加入 1mL 提取液研磨，超声波破碎细胞/细菌（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细胞数量（ $10^4$ ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

#### 2、检测步骤：

##### ① 酶标仪预热 30min，设定波长到 510nm。

##### ② 所有室温至室温（25℃）。在 96 孔板中依次加入：

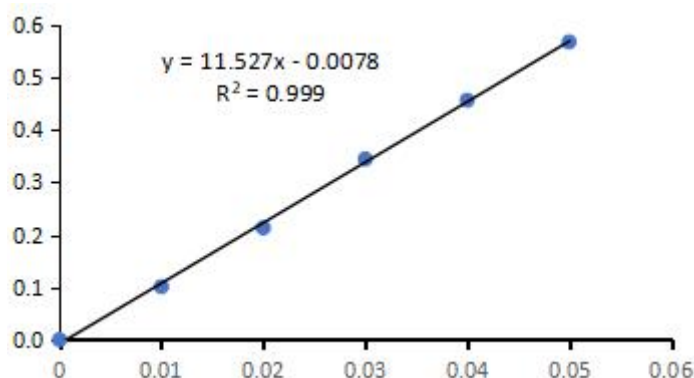
| 试剂组分（μL）      | 测定管 |
|---------------|-----|
| 试剂一           | 60  |
| 试剂二           | 100 |
| 样本            | 20  |
| 混匀，37℃孵育 5min |     |
| 试剂三           | 20  |

混匀，于 510nm 下读取吸光值 A1，37°C 孵育 20min 后读取吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

【注】：若  $\Delta A$  值在零附近，则增加样本加样体积 V1（如增至 50 $\mu$ L，则试剂一相应减少），或延长反应时间 T（如延长至 40min 或 60min），则改变后的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线：  $y = 11.527x - 0.0078$ ： x 为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 标准品( $\mu$ mol/L)， y 为  $\Delta A$ 。



2、按样本鲜重计算：

单位定义：在 37°C，每克组织每小时生成 1 $\mu$ molH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活单位 (U)。

$$GOD (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0078) \div 11.527] \div (W \times V1 \div V) \div T = 13 \times (\Delta A + 0.0078) \div W$$

3、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：在 37°C，每毫克组织蛋白每小时生成 1 $\mu$ molH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活单位 (U)。

$$GOD (\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0078) \div 11.527] \div (V1 \times Cpr) \div T = 13 \times (\Delta A + 0.0078) \div Cpr$$

4、按细胞/细菌数量计算：

单位定义：在 37°C，每 10<sup>4</sup> 个细胞/细菌每小时生成 1 $\mu$ molH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活单位 (U)。

$$GOD (\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0078) \div 11.527] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.026 \times (\Delta A + 0.0078)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

T---反应时间，20min=1/3h；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 标准品母液浓度为 250 $\mu$ mol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.5，1，1.5，2，2.5 $\mu$ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 标品稀释参照表如下：

|                                                                                             |   |     |    |     |     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---|-----|----|-----|-----|-----|
| 1. 吸取标准品母液 100 $\mu$ L，加入 900 $\mu$ L 蒸馏水，混匀得到 25 $\mu$ mol/mL 的标品稀释液；                      |   |     |    |     |     |     |
| 2. 吸取 25 $\mu$ mol/mL 的标品稀释液 100 $\mu$ L，加入 900 $\mu$ L 蒸馏水，混匀得到 2.5 $\mu$ mol/mL 的标品稀释液待用。 |   |     |    |     |     |     |
| 标品浓度<br>$\mu$ mol/mL                                                                        | 0 | 0.5 | 1  | 1.5 | 2   | 2.5 |
| 标品稀释液<br>$\mu$ L                                                                            | 0 | 40  | 80 | 120 | 160 | 200 |

|           |     |     |     |    |    |   |
|-----------|-----|-----|-----|----|----|---|
| 水 uL      | 200 | 160 | 120 | 80 | 40 | 0 |
| 各标准管混匀待用。 |     |     |     |    |    |   |

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

| 试剂名称 (μL)                                                    | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|--------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 标品                                                           | 20  |              |
| 蒸馏水                                                          |     | 20           |
| 试剂一                                                          | 80  | 80           |
| 试剂二                                                          | 100 | 100          |
| 混匀于 510nm 处读值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ |     |              |