北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

葡萄糖氧化酶（GOD）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：D17095

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 3 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 1 mL×1 支	-20℃保存

溶液的配制：

1、 工作液的配制：取 15 mL 试剂一和 3 mL 试剂二混匀（现配现用）；

2、 试剂三：融化后可分装-20℃保存。

产品说明：

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。

GOD催化葡萄糖产生H_2O_2，过氧化物酶在有氧存在时催化H_2O_2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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

（1）组织处理：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）细菌、细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清，按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎（功率 200w，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）。8000g 4℃离心 10 分钟，取上清，置冰上待测。

（3）血清（浆）：直接检测。

二、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、 加样表：

试剂名称（μL）	测定管
GOD工作液	174
试剂三	6
混匀，37℃水浴5min	
样本	20

样本测定前将GOD工作液与试剂三放入37℃水浴中保温，然后将上述试剂按顺序加入微量比色皿/96孔板中，加样本的同时开始计时；在500nm波长下记录20秒时的初始吸光度A1及2小时20秒时的吸光度A2。计算ΔA=A2-A1。

三、GOD活力单位的计算

a.用微量玻璃比色皿测定的计算公式如下

（1）按蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每小时催化产生1μmol氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

GOD活性（U/mg prot）=ΔA÷(ε×d)×V反总÷(Cpr×V样)÷T=0.667×ΔA÷Cpr

（2）按样本质量计算

单位的定义：每g组织在反应体系中每小时催化产生1μmol氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

GOD活性（U/g 质量）=ΔA÷(ε×d)×V反总÷(W÷V提取×V样)÷T=0.667×ΔA÷W

（3）按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每1万细菌或细胞在反应体系中每小时催化产生1μmol氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

GOD活性（U/10^4 cell）=ΔA÷(ε×d)×V反总÷(500÷V提取×V样)÷T=1.333×10^{-3}×ΔA÷W

（4）按血清（浆）体积计算

单位的定义：每mL血清（浆）在反应体系中每小时催化产生1μmol氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

GOD活性（U/mL）=ΔA÷(ε×d)×V反总÷T÷V样=0.667×ΔA

V反总：反应总体积，0.2mL；V样：加入样本体积，0.02mL；V提取：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞数量，500万；d：光径，1cm；ε：氧化型邻联茴香胺消光系数，7.5mL/μmol/cm；T：反应时间，2h。

b.用96孔板测定的计算公式如下

（1）按蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每小时催化产生1μmol氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

GOD活性（U/mg prot）=ΔA÷(ε×d)×V反总÷(Cpr×V样)÷T=1.111×ΔA÷Cpr

（2）按样本质量计算：

单位的定义：每g组织在反应体系中每小时催化产生1μmol氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

GOD活性（U/g 质量）=ΔA÷(ε×d)×V反总÷(W÷V提取×V样)÷T=1.111×ΔA÷W

（3）按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每1万细菌或细胞在反应体系中每小时催化产生1μmol氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

GOD活性（U/10^4 cell）=ΔA÷(ε×d)×V反总÷(500÷V提取×V样)÷T=2.222×10^{-3}×ΔA

（4）按血清（浆）体积计算

单位的定义：每mL血清（浆）在反应体系中每小时催化产生1μmol氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

GOD活性（U/mL）=ΔA÷(ε×d)×V反总÷T÷V样=1.111×ΔA

V反总：反应总体积，0.2mL；V样：加入样本体积，0.02mL；V提取：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞数量，500万；d：光径，0.6cm；ε：氧化型邻联茴香胺消光系数，7.5 mL/μmol/cm；T：反应时间，2h。

注意事项：

1、 不同匀浆组织中 GOD 活力不一样，做正式试验之前请做 1-2 次预试验，若 A2-A1>0.8，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 A2-A1<0.8，以提高检测灵敏度。实验过程中若出现 A1> A2 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。

相关发表文献：

[1] Yan Ma,Zhe Chi,Yanfeng Li,et al. Cloning, deletion, and overexpression of a glucose oxidase gene in Aureobasidium sp. P6 for Ca^{2+}-gluconic acid overproduction. Annals of Microbiology. October 2018;(IF1.431)

[2] Zhao S F, Jiang H, Chi Z, et al. Genome sequencing of Aureobasidium pullulans P25 and overexpression of a glucose oxidase gene for hyper-production of Ca^{2+}-gluconic acid[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2019, 112(5): 669-678.

参考文献：

[1] Han K, Wu Z, Lee J, et al. Activity of glucose oxidase entrapped in mesoporous gels[J]. Biochemical engineering journal, 2005, 22(2): 161-166.