

葡萄糖氧化酶法测定试剂盒 (Glucose Oxidase Method, GOD) E1010

描述: 葡萄糖能够为组织细胞提供能量。生理性饥饿、剧烈运动、营养不良都会导致血糖降低，糖尿病、肥胖等疾病会使血糖升高。采用氧化酶法进行葡萄糖含量测定，是世界卫生组织和中国《全国临床检验操作规程》推荐的临床血糖检测方法。本试剂盒对此法经过改良，使检测灵敏度比普通方法提高约 10 倍，其检测下限为 $5\sim 10\mu\text{mol/L}$ ，线性范围在 $10\sim 20000\mu\text{mol/L}$ 。适用于测定血液、细胞培养基内的低浓度葡萄糖含量，也胜任各种临床和基础实验中对于葡萄糖含量的测量。

原理: 根据 Trinder 反应原理^{1,2}，葡萄糖在葡萄糖氧化酶(GOD)作用下生成葡萄糖酸和过氧化氢(H_2O_2)；然后过氧化物酶(POD)催化过氧化氢，使色原物质(4-氨基安替比林)生成醌亚胺，颜色的深浅与葡萄糖浓度成正比。

参考文献:

1. Trinder, P. (1969). Annals of Clin. Biochem. 6: 24 – 27.
2. Barham D and Trinder P. (1972). Analyst 97: 142 – 145.

适用范围: 测定人及动物血清、血浆、脑脊液、等样品中的葡萄糖含量

组成: (1)1ml 葡萄糖标准品 10 mmol/L (相当于 180 mg/100 ml) (2) 32 ml 试剂 R1 (3) 8 ml 试剂 R2

储存条件: 4℃ 保存 6 个月有效

所需设备: 721、722 型可见分光光度计、酶标仪、生化分析仪。最佳工作波长 550-555nm，如仪器无此波长建议优先选用 570、530、490nm。

操作步骤:

一. **工作溶液配制:** 按 4:1 比例，取 8 ml 试剂 R1 与 2 ml 试剂 R2 混合得到 10 ml 工作溶液。当天使用或 4℃ 保存 1 周。

二. **标准品稀释:** 10 mM 葡萄糖标准品用蒸馏水或与样本缓冲液一致的液体稀释为 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 μM 。注意设置 0 浓度对照反应管。由于葡萄糖测定反应的线性关系甚好且范围很宽，通常设置黑体标记的 4 管即可，一般不需要设置大于 2~10mM 的标准管，以此得到的标准曲线用来测定大于 2 mM 葡萄糖浓度通常不会失真。世界卫生组织(WHO)推荐也可仅设置单一浓度的标准管。**注意:** 不能使用用户自己简单配制的葡萄糖标准溶液。

三、葡萄糖含量测定:

1. 参见下表加样。先加标准品或待测样品，后加工作溶液。可依据葡萄糖浓度高低微量调整样品与工作液体积比例。超出线性范围可适当稀释。
2. 37℃ 反应 20min (15~30min)或 25℃ 室温反应 30 min 但灵敏度略降。反应平衡后颜色在 60 min 内稳定。
3. 先用蒸馏水+工作液空白管调零，然后测定各管 OD 值。
4. 绘制标准曲线并计算葡萄糖浓度。
附 Excel 作图步骤: 各标准管 OD 值为 y 轴，浓度为 x 轴。(1)鼠标左键圈住数据，点击做图向导，选择-散点图-，点击-完成-。(2)鼠标右键点图上的某一点，点击-添加趋势线-，点击-选项-，点击-显示公式-和- R^2 值-。
5. 如果仅用单一标准管: 葡萄糖浓度(mmol/L) = 标准品浓度 × (样品管 OD - 空白管 OD) / (标准管 OD - 空白管 OD)。

加样表

(可微量调整样品与工作液体积比例)

96 孔微板测试 (反应体积 200 μl)				比色杯测试 (反应体积 800 μl)			
	空白管	标准管	样品管		空白管	标准管	样品管
蒸馏水 μl	5			蒸馏水 μl	20		
标准品 μl		5		标准品 μl		20	
标品 μl			5	标品 μl			20
工作溶液 μl	195	195	195	工作溶液 μl	780	780	780

说明:

1. 人空腹血糖参考值 3.89-6.11 mmol/L (70-110 mg/dl)，低血糖症临界水平 2.7-3.89 mmol/L，高血糖症临界水平 6.11-7.22 mmol/L。不同单位之间的换算公式: 1 mmol/L = 0.0555 mg/100 ml (dl); 1 mmol/L × 18 = 1 mg/100 ml (dl)。
2. 检测线性范围 **0.02~20 mmol/L**。浓度超过 20 mmol/L 用蒸馏水或生理盐水稀释 1-2 倍后测量。批内变异

系数为 0.7~2.0%，批间变异系数为~2%。准确度与精密度可达到临床检测要求。

3. **不能用于直接测定尿液葡萄糖含量。**尿液中尿酸浓度比较高，会消耗葡萄糖氧化酶反应中产生的过氧化氢，降低呈色反应，从而引起负误差使结果偏低。还原性物质如尿酸、抗坏血酸、胆红素、谷胱甘肽可竞争消耗反应产生的过氧化氢，使测定结果偏低。含强还原剂如二硫苏糖醇、巯基乙醇样品不建议使用本法。本法反应终体系可容忍的干扰物质最高浓度：血红蛋白 10 g/L，黄疸标本胆红素 340 $\mu\text{mol/L}$ ，氟化钠 3 g/L，尿素 46.7 mmol/L (280 mg/dl)，尿酸 2.95 mmol/L (50 mg/dl)，肌酐 4.42 mmol/L (50 mg/dl)，半胱氨酸 50 mg/dl，甘油三酯 500 mg/dl。
4. 《全国临床检验操作规程》指明测定血糖用草酸钾-氟化钠抗凝：每 5ml 血液加 0.2 ml 6%草酸钾-4%氟化钠；其优点是抑制糖酵解和分解，测得的葡萄糖浓度更接近真实；缺点是干扰其它生化检查项目。枸橼酸钠抗凝剂易引起溶血，也干扰许多生化检查项目。如必须用同一份标本做全套生化检测，可采用肝素钠抗凝剂。
5. 血样应在 30 分钟内完成测定。血清或血浆仍含大量血细胞，室温下糖酵解旺盛可消耗葡萄糖使测量值降低。室温放置 1 小时葡萄糖含量开始降低，3 小时后明显下降。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存血样，葡萄糖稳定性明显增加。使用血浆测定葡萄糖浓度可能更接近真实浓度。相比之下用血清标本测得的葡萄糖浓度偏低，且随着样品放置时间延长而明显下降。

使用普利莱葡萄糖氧化酶法测定试剂盒发表的 SCI 文章已超过 50 篇，以下仅列举数篇供参考：

- 1、 Li D, Song J Z, Li H, et al. Storage lipid synthesis is necessary for autophagy induced by nitrogen starvation[J]. FEBS letters, 2015, 589(2): 269-276.
- 2、 Zhang J D, Han L, Yan S, et al. The non-metabolizable glucose analog D-glucal inhibits aflatoxin biosynthesis and promotes kojic acid production in *Aspergillus flavus*[J]. BMC microbiology, 2014, 14(1): 95.
- 3、 Yang Y, Li W, Liu Y, et al. Alpha-lipoic acid attenuates insulin resistance and improves glucose metabolism in high fat diet-fed mice[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2014.
- 4、 Wang L L, Qiao J, Liu H H, et al. Ratiometric Fluorescent Probe Based on Gold Nanoclusters and Alizarin Red-Boronic Acid for Monitoring Glucose in Brain Microdialysate[J]. Analytical chemistry, 2014, 86(19): 9758-9764.
- 5、 Huang L, Gong L, Jiang X, et al. Photoactivation of GLUT4 translocation promotes glucose uptake via PI3-K/Akt2 signaling in 3T3-L1 adipocytes[J]. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2014, 7(03).
- 6、 Yan P, Zhang L, Feng Y, et al. SHR3824, a novel selective inhibitor of renal sodium glucose cotransporter 2, exhibits antidiabetic efficacy in rodent models[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2014, 35(5): 613-624.
- 7、 Yang M, Dai J, Jia Y, et al. Overexpression of juxtaposed with another zinc finger gene 1 reduces proinflammatory cytokine release via inhibition of stress - activated protein kinases and nuclear factor - κB [J]. FEBS Journal, 2014, 281(14): 3193-3205.
- 8、 Zhang X, Yang R, Jia Y, et al. Hypermethylation of Sp1 binding site suppresses hypothalamic POMC in neonates and may contribute to metabolic disorders in adults: impact of maternal dietary CLAs[J]. Diabetes, 2014, 63(5): 1475-1487.
- 9、 Liu Y, He R. Fasting induces a high level of 3-nitrotyrosine in the brain of rats[J]. Neuroscience letters, 2010, 472(3): 204-209.
- 10、 Fu H, Pang S, Xue P, et al. High Levels of Expression of Fibroblast Growth Factor 21 in Transgenic Tobacco (*Nicotiana benthamiana*)[J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2011, 165(2): 465-475.
- 11、 Zheng W, Feng X, Qiu L, et al. Identification of the antibiotic ionomycin as an unexpected peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligand with a unique binding mode and effective glucose-lowering activity in a mouse model of diabetes[J]. Diabetologia, 2013, 56(2): 401-411.
- 12、 Ma Y, Luo T, Xu W, et al. A new recombinant pituitary adenylate cyclase-activating peptide-derived peptide efficiently promotes glucose uptake and glucose-dependent insulin secretion[J]. Acta biochimica et biophysica Sinica, 2012: gms078.
- 13、 Zhang Z, Xue H L, Liu Y, et al. Yi-Qi-Zeng-Min-Tang, a Chinese medicine, ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic rats[J]. World journal of gastroenterology: WJG, 2011, 17(8): 987.
- 14、 Yang Q, He Y, Wang W. The protective effect of Liu-Wei-Di-Huang-Fang in salt-sensitive hypertension rats[J]. Clinical and Experimental Hypertension, 2013, 36(6): 426-432.