

组织细胞葡萄糖氧化酶法测定试剂盒 E1011

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、营养不良状态都会导致血糖降低, 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 5~10 μ mol/L, 线性范围在 10~20000 μ mol/L。适用于测定动物组织细胞内低浓度葡萄糖含量, 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(H₂O₂); 然后用过氧化物酶(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。

适用范围: 适用于动物实体组织、培养细胞中葡萄糖含量的测定。

组成 (105 次微量检测):

(1) 1 ml 葡萄糖标准品 10 mmol/L (等于 180 mg/100 ml);

(2) 16 ml 试剂 R1; (3) 4 ml 试剂 R2; (4) 50 ml 裂解液

以上组分 4 °C 保存 6 个月有效。

所需设备: 721、722 型可见光分光光度计、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. **组织细胞裂解:** 1、动物细胞: 离心收集细胞后, 通常情况下, 可按比例每 1 \times 10⁶ 个细胞加入 0.05-0.1ml 裂解液, 震荡裂解后室温静置 10 分钟。2、实体组织: 离心管精确称重, 加入组织块后再称重, 二者相减(即减量称重法)计算组织重量(约 50mg)。建议按每 1mg 组织加入 5-10 μ l 裂解液, 用玻璃匀浆器或者电动匀浆器匀浆破碎组织, 匀浆后室温静置 10 分钟。

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 μ l)				比色杯测试 (反应体积 800 μ l)			
	空白管	标准管	样品管		空白管	标准管	样品管
蒸馏水 μ l	5			蒸馏水 μ l	20		
标准品 μ l		5		标准品 μ l		20	
样品 μ l			5	样品 μ l			20
工作溶液 μ l	195	195	195	工作溶液 μ l	780	780	780

说明:

- 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 \times 18 = 1 mg/100 ml (dl)。
- 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。
- 《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。
- 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 °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。

参考文献:

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

二. **裂解液处理:** 取适量上清液转移到 1.5ml 离心管中, 余下的裂解液可用 BCA 法蛋白定量试剂盒(P1511)进行蛋白定量或 -20°C 储存。

三. **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°C 保存 1 周。

四. **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 μ M。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。**

五. **葡萄糖含量测定:**

- 参见下表加样。先加标准品或待测样品, 后加工作溶液。可依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。
- 37°C 反应 20min (15~30min) 或 25°C 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。
- 先用蒸馏水+工作液空白管调零, 然后测定各管 OD5 值。
- 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-R²值-。
- 如果仅用单一标准管: 葡萄糖浓度(mmol/L) = 标准品浓度 \times (样品管 OD - 空白管 OD) / (标准管 OD - 空白管 OD)。
- 以每 mg 蛋白浓度或细胞数校正葡萄糖含量。