

乙二醛酶I(glyoxalase I,GlyI) 活性测定说明书

(货号: G0144W 微板法 96 样)

一、产品简介:

乙二醛酶系统是甲基乙二醛 (MG) 的主要清除途径, 乙二醛酶 I (Gly I, EC 4.4.1.5) 是一种组成乙二醛酶系统的胞质酶。

乙二醛酶 I (Gly I) 通过催化甲基乙二醛 (MG) 和还原型谷胱甘肽形成 S-D-乳酰谷胱甘肽(S-D-lactoylglutathione, SLG), SLG 在 240nm 处有特征吸收峰, 通过检测 240nm 值的增加速率, 进而计算出乙二醛酶 I (Gly I) 酶活性的大小。

二、测试盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体×1 支	4°C保存	临用前甩几下或离心使液体落入底部, 再加入 1.1mL 蒸馏水, 混匀备用。
试剂二	粉体×1 支	4°C保存	临用前甩几下或离心使粉体落入底部, 再加入 1.1mL 蒸馏水, 混匀备用。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板 (UV 板)、可调式移液器、研钵、蒸馏水。

四、乙二醛酶I(GlyI)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取 0.1g 组织样本(水分充足可取 0.2g), 先加入 1mL 的提取液, 冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C离心 10min, 上清液待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

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

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^6): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 240nm。

② 制备反应 mix: 按照试剂一: 试剂二: 试剂三=10:10:160 的比例混合, 避光孵育 10min, 两个小时内用完。

③ 在 96 孔板 (UV 板) 中依次加入下列试剂:

试剂名称 (μ L)	测定管
反应 mix	180
样本	20
混匀, 室温 (25°C) 下, 30s 时于 240nm 处读取吸光值 A1, 5min 后再读取 A2。 $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】：1. 若 ΔA 值在零附近徘徊，可增加反应时间 T（如增至 10min 后读取 A2），
则改变后的 T 需代入公式计算。

2. 若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以对样本用蒸馏水进行稀释（如稀释 3 倍），则稀释倍数 D 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟生成 1nmol 的 SLG 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GlyI}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D = 1187 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times D$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟生成 1nmol 的 SLG 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GlyI}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 1187 \times \Delta A \div W \times D$$

3、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟生成 1nmol 的 SLG 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GlyI}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 1187 \times \Delta A \div 500 \times D$$

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积， 2×10^{-4} L；

W---样本质量，g；

ϵ ---SLG 的摩尔消光系数， 3.37×10^3 L/mol/cm；

500---细胞数量，万；

Cpr---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。

V---加入提取液体积，1mL；

d---96 孔板光径，0.5cm；

T---反应时间，5min；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；