

乙二醛酶II(glyoxalaseII,GlyII) 活性测定说明书

(货号: G0145W 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II (GlyII, EC 3.1.2.6) 是乙二醛酶系统中的一种酶。在哺乳动物, 植物和细菌中普遍表达。

乙二醛酶II催化 S-D-乳酰谷胱甘肽(S-D-lactoylglutathione, SLG)水解为还原型谷胱甘肽 (GSH) 和 D-乳酸。还原型谷胱甘肽 (GSH) 与 DTNB 与反应生成黄色复合物, 该有色物质在 412nm 处有特征吸收峰; 通过检测 412nm 处上升速率, 进而得出乙二醛酶II(GlyII) 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	提取液 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	4℃保存	
试剂三	粉体 mg×2 支	-20℃保存	每支用前甩几下使试剂落入底部, 分别加 0.55mL 蒸馏水完全溶解备用, 溶好的试剂可-20℃分装保存, 禁止反复冻溶。
标准品	粉体 mg×支	-20℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、低温离心机、研钵、蒸馏水。

四、乙二醛酶II(GlyII)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℃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℃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 (10⁴): 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, 调节波长至 412nm。

② 所有试剂预热至室温 (25℃), 在 96 孔板中依次加入下列试剂 (依据样本检测数量, 试剂一和二可按照比例 130:10 提前混合, 直接加 140μL 即可):

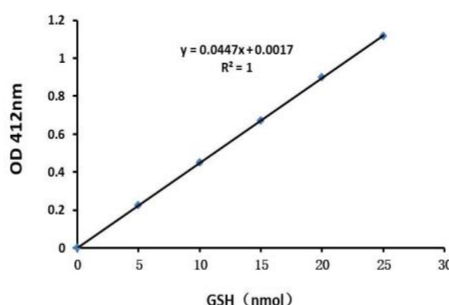
试剂名称 (μL)	测定管
样本	50
试剂一	130
试剂二	10
试剂三	10
混匀, 室温 (25℃) 下, 1min 后立即于 412nm 处读取吸光值 A1, 3min 后再读取 A2。ΔA=A2-A1。	

【注】：1.若 ΔA 值在零附近徘徊，可增加样本加样体积 V_1 （如增至 100 μ L，则试剂一相应减少），或增加反应时间 T （如增至 10min 后读取 A_2 ），或增加样本取样质量 W 。则改变后的 V_1 和 T 和 W 需代入公式计算。

2.若 ΔA 值大于 0.8 或者 A_1 值大于 1，则需减少样本加样体积 V_1 （如减至 20 μ L，则试剂一相应增加），或减少反应时间 T （如减至 1min 后读取 A_2 ）。则改变后的 V_1 和 T 需代入公式计算。

五、结果计算：

1、标准曲线为 $y = 0.0447x + 0.0017$ ； x 为标准品摩尔质量（nmol）， y 为 ΔA 。



2、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 GSH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GlyII}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0017) \div 0.0447] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 149.14 \times (\Delta A - 0.0017) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织样本每分钟生成 1nmol 的 GSH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GlyII}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0017) \div 0.0447] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 149.14 \times (\Delta A - 0.0017) \div W$$

4、按细胞数量计算：

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

$$\text{GlyII}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0017) \div 0.0447] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 149.14 \times (\Delta A - 0.0017) \div 500$$

V_1 ---加入样本体积，0.05mL；

V ---加入提取液体积，1mL；

W ---样本质量，g；

T ---反应时间，3min；

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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（10 μ mol/mL）：标准品溶于 1mL 蒸馏水中，（母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C 保存）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依次在 96 孔板中加入 50 μ L 标准品+140 μ L 试剂一+10 μ L 试剂二，混匀后静置 5min 后于 412nm 读值，根据结果即可制作标准曲线。