

乙二醛酶II(glyoxalaseII,GlyII) 活性测定说明书

(货号: G0145F24 分光法 24 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-lactoylgutathione, 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 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 0.5mL×1 支	4℃保存	
试剂三	粉体 mg×支	-20℃保存	用前甩几下使试剂落入底部,再加 0.55mL 蒸馏水完全溶解备用,溶好的试剂可-20 度分装保存,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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、可调式移液器、低温离心机、研钵。

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(10^4):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

2、上机检测:

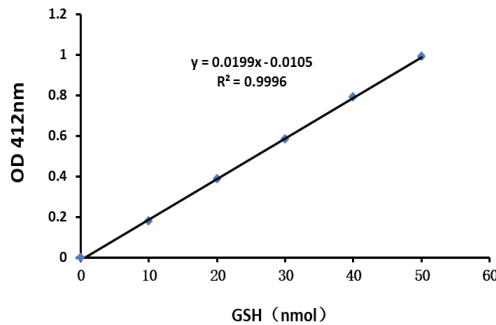
① 可见分光光度计预热,调节波长至 412nm,蒸馏水调零。

② 所有试剂预热至室温(25℃),在 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)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 570:20 提前混合,直接加 590 μ L 即可):

试剂名称(μ L)	测定管
样本	100
试剂一	570
试剂二	20
试剂三	20
混匀,室温(25℃)下,30s 后立即于 412nm 处读取吸光值 A1,3min 后再读取 A2。 $\Delta A=A2-A1$ 。	

五、结果计算：

1、标准曲线为 $y = 0.0199x - 0.0105$ ；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。

$$\text{GlyII}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0105) \div 0.0199] \div (V1 \times Cpr) \div T = 167.5 \times (\Delta A + 0.0105) \div Cpr$$

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。

$$\text{GlyII}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0105) \div 0.0199] \div (W \times V1 \div V) \div T = 167.5 \times (\Delta A + 0.0105) \div W$$

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。

$$\text{GlyII}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0105) \div 0.0199] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 167.5 \times (\Delta A + 0.0105) \div 500$$

V1---加入样本体积，0.1mL；

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 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)：标准品溶于 1mL 蒸馏水中，(母液需在两天内用且-20 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依次在 EP 管中加入 100 μL 标准品+590 μL 试剂一+20 μL 试剂二，混匀后静置 5min 后全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中，于 412nm 读值，根据结果即可制作标准曲线。