

乙二醛酶II(glyoxalaseII,GlyII) 活性测定说明书

(货号: BP10055W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	提取液 110mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂一	液体 13mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	4°C避光保存	
试剂三	粉体 2 支	-20°C保存	每支: 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 0.55mL 蒸馏水完全溶解备用; 3. 溶好的试剂可-20 度分装保存, 禁止反复冻溶。
标准品	粉体 1 支	-20°C保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 细菌/真菌样本:

按照细胞数量(10^4 个): 提取液体积(mL) 为 500~1000: 1 的比例(建议 500 万细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞(功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 12000rpm, 4°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

2、检测步骤:

①酶标仪预热 30min(或等待仪器过自检程序亦可), 调节波长至 412nm。

②所有试剂预热至室温(25°C), 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

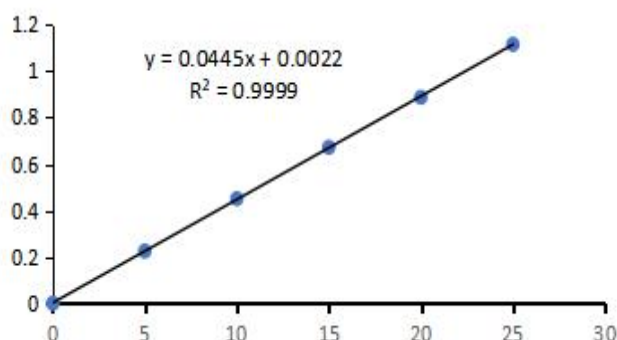
可按照比例 130:10 提前混合，直接加 140μL 即可）：

试剂组分 (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。 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】：1. 若 ΔA 值在零附近徘徊，可增加样本加样体积 V1（如增至 100μL，则试剂一相应减少），或增加反应时间 T（如增至 10min 后读取 A2），或增加样本取样质量 W。则改变后的 V1 和 T 和 W 需代入公式计算。
2. 若 ΔA 值大于 0.8 或者 A1 值大于 1，则需减少样本加样体积 V1（如减至 20μL，则试剂一相应增加），或减少反应时间 T（如减至 1min 后读取 A2）。则改变后的 V1 和 T 需代入公式计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线为 $y = 0.0445x + 0.0022$ ；x 为标准品摩尔质量（nmol），y 为 ΔA 。



- 2、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。

$$\text{GlyII}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0022) \div 0.0445] \div (W \times V1 \div V) \div T = 149.81 \times (\Delta A - 0.0022) \div W$$

- 3、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。

$$\text{GlyII}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A - 0.0022) \div 0.0445] \div (V1 \times \text{Cpr} \div V) \div T = 149.81 \times (\Delta A - 0.0022) \div \text{Cpr}$$

- 4、按样本体积计算：

酶活定义：每毫升样本每分钟生成 1nmol 的 GSH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GlyII}(\text{nmol}/\text{min}/\text{ml}) = [(\Delta A - 0.0022) \div 0.0445] \div V1 \div T = 149.81 \times (\Delta A - 0.0022)$$

- 5、按细菌/细胞数量计算：

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

$$\text{GlyII}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0022) \div 0.0445] \div (V1 \times 500 \div V) \div T = 0.3 \times (\Delta A - 0.0022)$$

V1---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---细菌或细胞总数，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 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 标准管中加 1mL 蒸馏水充分溶解，即得到 10 μ mol/mL 标准品母液；
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 100 μ L，加入 1.9mL 蒸馏水，混匀得到 0.5 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，以标准品摩尔质量（nmol）为 x， ΔA 为 y，过 0 点制作标准曲线。

试剂组分（ μ L）	标准管	0 浓度管（仅测一次）
标品	50	
蒸馏水		50
试剂一	140	140
试剂二	10	10
室温（25 $^{\circ}$ C）下，混匀，5min 后于 412nm 读值。 $\Delta A=A$ 标准-A0 浓度。		