

乙二醛酶 I (glyoxalase I, Gly I) 活性测定说明书

(货号: BP10056W 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 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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水, 混匀备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 1 支	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水, 混匀备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	

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 (UV 板)、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、乙二醛酶I(GlyI)活性测定:

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℃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 (10⁴ 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℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上 (或等待仪器过自检程序亦可), 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:

试剂组分 (μL)	测定管
反应 mix	180
样本	20
混匀，室温 (25℃) 下，30s 时于 240nm 处读取吸光值 A1，5min 后再读取 A2。ΔA=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。

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

$$= 1187 \times \Delta A \div W \times D$$

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 SLG 定义为一个酶活力单位。

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

$$= 1187 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times D$$

3、按样本体积计算：

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

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

$$= 1187 \times \Delta A \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ cell 每分钟生成 1nmol 的 SLG 定义为一个酶活力单位。

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

$$= 2.374 \times \Delta A \times D$$

V1---加入样本体积，0.02mL；

V---加入提取液体积，1mL；

V2---反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

W---样本质量，g；

T---反应时间，5min；

ε---SLG 的摩尔消光系数，3.37×10³ L/mol/cm；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

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。