

乙二醛酶II(glyoxalaseII,GlyII) 活性测定说明书

(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	每支使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：

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、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）：

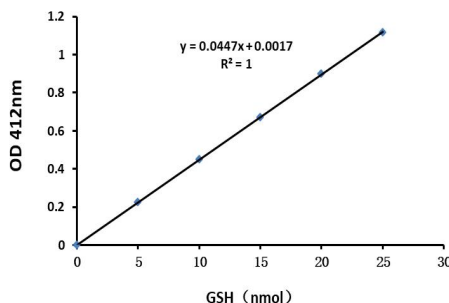
试剂名称（μL）	测定管
样本	50
试剂一	130
试剂二	10
试剂三	10
混匀，室温（25℃）下，1min 后立即于 412nm 处读取吸光值 A1，3min 后再读取 A2。 $\Delta A=A2-A1$ 。	

【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 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。

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

- 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。

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

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;

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。