

乙二醛酶II(glyoxalaseII,GlyII) 活性测定说明书

(分光法 48 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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 1mL ×1 支	4°C保存	
试剂三	粉体 mg×2 支	-20°C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 度分装保存, 禁止反复冻溶。
标准品	粉体 mg×支	-20°C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、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°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、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°C), 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 590μL 即可):

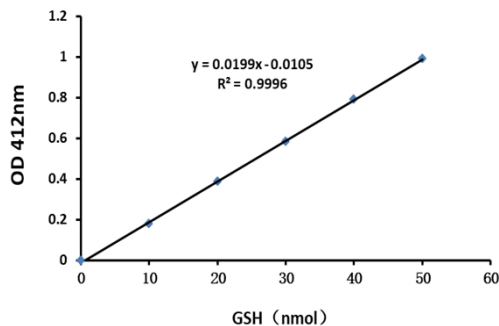
试剂名称 (μL)	测定管
样本	100
试剂一	570
试剂二	20
试剂三	20
混匀, 室温 (25°C) 下, 30s 后立即于 412nm 处读取吸光值 A1, 3min 后再读取 A2。	

$$\Delta A = A_2 - A_1。$$

- 【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 $200\mu\text{L}$, 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 1.2 , 则需减少样本加样体积 V_1 (如减至 $50\mu\text{L}$, 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 $y = 0.0199x - 0.0105$; 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。

$$\text{GlyII}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0105) \div 0.0199] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T = 167.5 \times (\Delta A + 0.0105) \div C_{\text{pr}}$$

- 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。

$$\text{GlyII}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0105) \div 0.0199] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 167.5 \times (\Delta A + 0.0105) \div W$$

V_1 ---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 ;

C_{pr} ---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°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 $100\mu\text{L}$ 标准品 + $590\mu\text{L}$ 试剂一 + $20\mu\text{L}$ 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。