乙二醛酶II(glyoxalaseII,GlyII) 活性测定说明书

（货号：G0145W48 微板法 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℃保存	
试剂一	液体 7mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 mL ×1 支	4℃保存	
试剂三	粉体 mg×1 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℃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）：

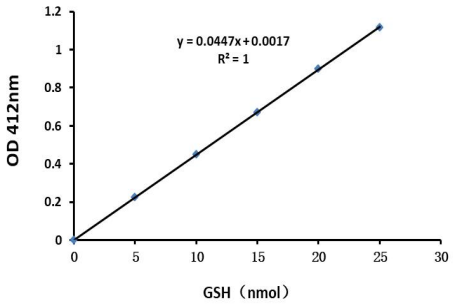
试剂名称（μL）	测定管
样本	50
试剂一	130
试剂二	10
试剂三	10
混匀，室温（25℃）下，1min 后立即于 412nm 处读取吸光值 A1，3min 后再读取 A2。ΔA=A2-A1。	

【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 = 0.0447x + 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。

GlyⅡ(nmol/min/mg prot)=[(ΔA-0.0017)÷0.0447]÷(V1×Cpr)÷T=149.14×(ΔA-0.0017)÷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。

GlyⅡ(nmol/min/g 鲜重)=[(ΔA-0.0017)÷0.0447]÷(W×V1÷V)÷T=149.14×(ΔA-0.0017)÷W

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；

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（10μmol/mL）：标准品溶于 1mL 蒸馏水中，（母液需在两天内用且-20℃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. μmol/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 50μL 标准品+140μL 试剂一+10μL 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。