

乙二醛酶 I (glyoxalase I, Gly I) 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 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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体×1 支	4°C保存	临用前甩几下或离心使液体落入底部, 再加入 1.1mL 蒸馏水, 混匀备用。
试剂二	粉体×1 支	4°C保存	临用前甩几下或离心使粉体落入底部, 再加入 1.1mL 蒸馏水, 混匀备用。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板 (UV 板)、可调式移液器、研钵、蒸馏水。

四、乙二醛酶I(GlyI)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 酶标仪预热 30min 以上, 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:

试剂名称 (μL)	测定管
反应 mix	180
样本	20
混匀, 室温 (25°C) 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。

$$\begin{aligned}\text{Gly I (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 1187 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times D\end{aligned}$$

2、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。

$$\begin{aligned}\text{Gly I (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 1187 \times \Delta A \div W \times D\end{aligned}$$

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积， 2×10^{-4} L；

W---样本质量，g；

ϵ ---SLG 的摩尔消光系数， 3.37×10^3 L/mol/cm；

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。

V---加入提取液体积，1mL；

d---96 孔板光径，0.5cm；

T---反应时间，5min；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。