Glyoxalase I (Gly I) activity Activity Assay Kit

乙二醛酶I（GlyI）活性测定说明书

货号：BN72654 | 方法：微板法 | 规格：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℃保存	
试剂一	液体×1 支	4℃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℃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℃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。

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：

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 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 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℃）下，30s 时于 240nm 处读取吸光值 A1，5min 后再读取 A2。ΔA=A2-A1。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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。

$GlyI(nmol/min/mg\ prot)=[\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times10^9\times V2]\div(V1\times Cpr)\div T\times D=1187\times\Delta A\div Cpr\times D$

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。

$GlyI(nmol/min/g\ 鲜重)=[\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times10^9\times V2]\div(W\times V1\div V)\div T\times D=1187\times\Delta A\div W\times D$

3、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟生成 1nmol 的 SLG 定义为一个酶活力单位。

$GlyI(nmol/min/10^4\ cell)=[\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times10^9\times V2]\div(500\times V1\div V)\div T\times D=1187\times\Delta A\div500\times D$

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，3.37×10^3 L/mol/cm；
D---稀释倍数，未稀释即为 1；
500---细胞数量，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。