

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0947

Size: 100T/96S

羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶(HMGCS)检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶是甲羟戊酸代谢途径中的关键酶, 催化乙酰 CoA 与乙酰乙酰 CoA 生成羟甲基戊二酰 CoA。

二、测定原理:

HMGCS 催化乙酰 CoA 与乙酰乙酰 CoA 生成羟甲基戊二酰 CoA, 同时产生 CoASH, 使 DTNB 转化为黄色的 TNB, 在 412nm 下有特征吸光值。

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存	临用前加入 3mL 蒸馏水充分溶解待用; 用不完的试剂 分装后-20℃保存, 禁止反复冻融
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存	临用前加入 3mL 蒸馏水充分溶解待用; 用不完的试剂 分装后-20℃保存, 禁止反复冻融
试剂三	6mL×1 瓶	4℃避光保存	

五、样本测定的准备

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例 (建议 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 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)；8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1:5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液)，进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品：直接检测。

六、测定步骤

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm，蒸馏水调零。
2. 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 25 μ L 试剂一、25 μ L 试剂二和 50 μ L 试剂三，混匀，加入 100 μ L 样本上清，迅速混匀后记录 412nm 下初始吸光值 A1 和 4min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

七、HMGCS 活性计算

- 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清 (浆) 活性

单位定义：每 mL 血清 (浆) 每分钟催化产生 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min /mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 36.76 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞 HMGCS 活性

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义： 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 36.76 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义： 每 g 组织每分钟催化产生 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 36.76 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位定义： 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min/10}^4\text{cel)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.074 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : TNB 摩尔消光系数, 1.36×10^4 L / mol /cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 4 min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

● 用 96 孔板测定的计算公式如下

1、血清(浆)活性

单位定义： 每 mL 血清(浆)每分钟催化产生 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min /mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 73.53 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞 HMGCS 活性

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$
$$= 73.53 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟催化产生 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 73.53 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min /} 10^4 \text{cel)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 0.147 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ε : TNB 摩尔消光系数, 1.36×10^4 L / mol /cm;
 d : 96 孔板光径, 0.5cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 4 min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。