

羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 (HMGCS) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC5435

规格: 100T/96S

产品内容: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂二	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂三	液体 6mL×1 瓶	2-8°C保存

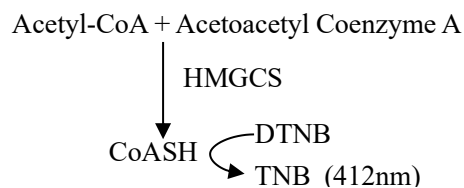
溶液的配制:

- 1、试剂一: 临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解。-20°C分装以保存 4 周, 避免反复冻融。
- 2、试剂一工作液的配制: 按照试剂一: 蒸馏水=20μL: 460μL (480μL, 约 9T) 的比例配制, 根据样本量现配现用, 当天用完。
- 3、试剂二: 临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解。-20°C分装以保存 4 周, 避免反复冻融。
- 4、试剂二工作液的配制: 按照试剂二: 蒸馏水=30μL: 330μL (360μL, 约 90T) 的比例配制, 根据样本量现配现用, 当天用完。

产品说明:

羟甲基戊酸途径是一个非常重要的代谢途径, 该参与许多重要萜类的前体物的合成, 是萜类生物合成的重要途径。羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶催化乙酰 CoA 和乙酰乙酰 CoA, 生成羟甲基戊二酰辅酶 A, 是胆固醇和类异戊二烯生物合成中的关键步骤。

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。



注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、分析天平、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、蒸馏水和冰。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1. 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. 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 (10⁶ 个)：提取液体积 (mL) 为 5~10：1 的比例（建议 5 百万细菌或细胞加入 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）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm，可见分光光度计用蒸馏水调零。
2. 根据样本量取部分试剂一工作液、试剂二工作液、试剂三于 37℃预热 10min。
3. 操作表：（在微量玻璃比色皿或者 96 孔板中加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
试剂一工作液	25	25
试剂二工作液	25	25
试剂三	50	50
样本	100	-
提取液	-	100

将上述试剂加入微量玻璃比色皿或者 96 孔板中充分混匀，于 412nm 处测定 10s 的吸光值 A1，迅速置于 37℃ 水浴或恒温培养箱 20min（酶标仪有控温功能可将温度调至 37℃），拿出后迅速擦干并测定 20min10s 时的吸光值 A2。计算 $\Delta A_{测定} = A2_{测定} - A1_{测定}$ ， $\Delta A_{空白} = A2_{空白} - A1_{空白}$ ， $\Delta A = \Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}$ 。空白管只需做 1-2 次。

三、HMGCS 活性计算

A 按微量石英比色皿计算：

1. 按蛋白浓度计算

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

$$\text{HMGCS活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{反总} \div (V_{样} \times C_{pr}) \div T = 7.353 \times \Delta A \div C_{pr}$$

2. 按样本质量计算

酶活定义：每g组织每分钟催化产生1nmol TNB 为一个酶活力单位。。

$$\text{HMGCS活性 (U/g 质量)} = \Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div T = 7.353 \times \Delta A \div W$$

3. 按细胞/细菌数量计算

酶活定义：每10⁶个细菌或细胞每分钟催化产生1nmol TNB 为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (N \times V_{样} \div V_{样总}) \div T = 7.353 \times \Delta A \div N$$

V反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；ε：TNB 摩尔消光系数，1.36×10⁴ L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.1 mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，20 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细胞或细菌总数，以10⁶计。

B 按96孔UV板计算：

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm（96孔板光径）进行计算即可。

注意事项：

1. 如果 ΔA 吸光值过低或接近空白，适当延长反应时间或加大样本量后，重新测定。注意同步修改计算公式。

2. 如果 $A2 > 1/\Delta A > 0.8$ (比色皿) 或者 $A2 > 1/\Delta A > 0.6$ (96 孔板), 建议将样本适当稀释后或者缩短反应时间进行测定。注意同步修改计算公式。

实验实例:

1. 称取 0.1046g 平菇, 加入提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 ΔA 测定 = $A2$ 测定 - $A1$ 测定 = $0.906 - 0.652 = 0.254$, ΔA 空白 = $A2$ 空白 - $A1$ 空白 = $0.121 - 0.104 = 0.017$, $\Delta A = \Delta A$ 测定 - ΔA 空白 = 0.237 , 按样本质量计算酶活得:

$$\text{HMGCS活性 (U/g 质量)} = 12.255 \times \Delta A \div W = 27.767 \text{ U/g 质量}$$

2. 称取 0.1070g 青椒, 加入提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 ΔA 测定 = $A2$ 测定 - $A1$ 测定 = $0.342 - 0.240 = 0.102$, ΔA 空白 = $A2$ 空白 - $A1$ 空白 = $0.121 - 0.104 = 0.017$, $\Delta A = \Delta A$ 测定 - ΔA 空白 = 0.085 , 按样本质量计算酶活得:

$$\text{HMGCS活性 (U/g 质量)} = 12.255 \times \Delta A \div W = 9.735 \text{ U/g 质量}$$

参考文献:

- [1] Skaff D A, Mizioro H M. A visible wavelength spectrophotometric assay suitable for high-throughput screening of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase[J]. Analytical Biochemistry, 2010, 396(1):96-102
- [2] Scharnagl H, W März, Schliack M, et al. A novel assay for cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase activity using reversed-phase ion-pair chromatography: demonstration that Lifibrol (K12.148) modulates the enzyme activity[J]. Journal of Lipid Research, 1995, 36(3):622-627.

相关系列产品:

- BC0550/BC0555 脂肪酸合成酶 (FAS) 活性检测试剂盒
- BC0590/BC0595 游离脂肪酸 (FFA) 含量检测试剂盒
- BC0620/BC0625 甘油三酯 (TG) 含量检测试剂盒
- BC1890/BC1895 游离胆固醇 (FC) 含量检测试剂盒
- BC1980/BC1985 总胆固醇 (TC) 含量检测试剂盒
- BC2340/BC2345 脂肪酶 (LPS) 活性检测试剂盒

