

羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 (HMGCS) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

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。

组成:

产品名称	KC016-50T/48S	Storage
提取液: 液体	60ml	4°C
试剂一: 粉剂	1 瓶	-20°C避光
试剂二: 粉剂	1 瓶	-20°C避光
试剂三: 液体	15ml	4°C避光
说明书	一份	

试剂一: 粉剂×1 瓶, -20°C避光保存; 临用前加入 7ml 蒸馏水充分溶解待用; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20°C避光保存; 临用前加入 7ml 蒸馏水充分溶解待用; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;

自备仪器和用品:

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线: 0518-81263339

官网:<http://www.bio149.com>

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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。
- 2、在 1 ml 玻璃比色皿中加入 125μl 试剂一、125μl 试剂二和 250μl 试剂三, 混匀, 加入 500μl 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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

HMGCS 活性计算:

1、血清 (浆) 活性

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

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

(2) 按样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1nmolTNB 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 1nmolTNB 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_{反总}: 反应体系总体积, 1×10⁻³ 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, 0.5 ml; V_{样总}: 加入提取液体积, 1ml; T: 反应时间, 4 min; Cpr: 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。

