

## 羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 (HMGCS) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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	KC017-100T/96S	Storage
提取液: 液体	100ml	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	6ml	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 3ml 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 3ml 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/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。

### 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。

### 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 $\mu$ l 试剂一、25 $\mu$ l 试剂二和 50 $\mu$ l 试剂三，混匀，加入 100 $\mu$ 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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

### 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 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。

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

###### (2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟催化产生 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，2 $\times 10^4$  L； $\epsilon$ ：TNB 摩尔消光系数，1.36 $\times 10^4$  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，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。

#### 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 1nmolTNB 为一个酶活力单位。

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

##### 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 1nmolTNB 为一个酶活力单位。

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

###### (2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟催化产生 1nmolTNB 为一个酶活力单位。

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



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

(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 1nmolTNB 为一个酶活力单位。

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

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：TNB 摩尔消光系数， $1.36 \times 10^4$  L / mol / cm；d：96 孔板光径，0.5cm；

V 样：加入样本体积，0.1 ml；V 样总：加入提取液体积，1 ml；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。

