

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

注 意：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。

所需的仪器和用品：

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。

试剂的组成和配制：

提取液：60mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：粉剂×1 瓶，-20℃ 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℃ 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 7mL 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；

试剂三：15mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

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 125 μ L 试剂一、125 μ L 试剂二和 250 μ L 试剂三，混匀，加入 500 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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

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， 1.36×10^4 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。