



羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶活性检测试剂盒

HMGCS Assay Kit

微量法

产品编号: AK411M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES411	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK411-A	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存; 临用前加入3mL 蒸馏水充分溶解待用; 剩余试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融;
AK411-B	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存; 临用前加入3mL 蒸馏水充分溶解待用; 剩余试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融;
AK411-C	6mL×1 瓶	4℃避光保存。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 羟甲基戊二酰辅酶A 合成酶 (HMGCS) 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。

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。

自备用品:

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。

样本的前处理:

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离:

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): ES411 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES411), 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): ES411 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES411), 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:

- 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。
- 样本测定 (在微量石英比色皿或 96 孔板中加入):

试剂名称	测定管 (μL)
AK411-A	25
AK411-B	25
AK411-C	50
混匀,	
样本上清	100

迅速混匀后立即在412nm波长下记录初始吸光值A1和4min后的吸光值A2。计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

HMGCS 酶活性计算:

a. 使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。

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

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。

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

(2) 按样本鲜重计算

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

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

(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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 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, 0.1 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液 (ES411) 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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

b. 使用 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。

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

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。

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

(2) 按样本鲜重计算

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

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

(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 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 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 (ES411) 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。