

羟甲基戊二酰辅酶A合成酶（HMGCS）活性检测试剂盒 （微量法）

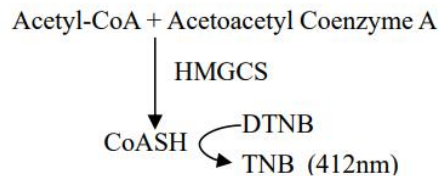
产品货号：BA2192

产品规格：100T/96S

产品简介：

甲羟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。

产品组成：

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

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9T）的比例配制，根据样本量现配现用，当天用完。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、分析天平、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°C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(10^6 个)：提取液体



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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°C 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°C 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°C 水浴或恒温培养箱 20min (酶标仪有控温功能可将温度调至 37°C), 拿出后迅速擦干并测定 20min 10s 时的吸光值 A2。计算 ΔA 测定 = A2 测定 - A1 测定, ΔA 空白 = A2 空白 - A1 空白, $\Delta A = \Delta A$ 测定 - ΔA 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

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

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

(2) 按样本质量计算

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

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

(3) 按细胞/细菌数量计算

酶活定义: 每 10^6 个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

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

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^4 L; ϵ : TNB 摩尔消光系数, 1.36×10^4 L / mol / cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.1mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 20min; 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 10^6 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com