

植物HMG-CoA还原酶(HMGR)活性检测试剂盒 (紫外分光光度法)

产品货号: BA3496

产品规格: 50T/48S

产品简介:

3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶(3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl Coenzyme A Reductas, HMGR; EC1.1.1.34), 是由887个氨基酸残基组成的糖蛋白, 存在于肝脏、肠道及其他组织的内质网。它是肝细胞合成胆固醇过程中的限速酶, 催化生成甲羟戊酸, 抑制HMG-CoA还原酶能阻碍胆固醇合成。

HMG-CoA在HMGR酶的催化作用下消耗2份子NADPH生成3-甲基-3, 5-二羟戊酸(甲羟戊酸)和2份子NADP⁺, 通过测定340nm处吸光值的变化, 从而测定HMGR酶活性。



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。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体60mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体0.6mL×1支	-20℃
试剂一	液体35mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体6mL×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃

溶液的配制:

1. 提取液二: -20℃保存会析出, 常温震荡溶解后使用, 有挥发性, 使用后及时封口, 避免挥发。
2. 提取液: 临用前根据样本量按照提取液一: 提取液二=990μL:10μL(共 1mL, 1T)的比例配制成提取液后使用, 现配现用, 禁止一次性全部混合。
3. 试剂三: 试剂置于棕色试剂瓶内玻璃瓶中, 临用前加入 7mL 蒸馏水充分溶解, 未用完的试剂-20℃分装保存 4 周, 避免反复冻融。
4. 工作液的配制: 临用前根据样本量按照试剂一:试剂二工作液:试剂三=550μL:100L:100μL(共 750μL, 约 1T)配制成工作液使用, 现配现用。

所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、水浴锅/金属浴、台式离心机、可调式移液器、1mL石英比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

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. 植物组织样本: 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。4℃, 12000g 离心 10min, 取上清液置于冰上待测。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 操作表: (在 1mL 石英比色皿中加入以下试剂)



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

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本	250	-
蒸馏水	-	250
工作液	750	750

充分混匀，立即测定340nm下10s时的初始吸光值A1，之后迅速将比色皿连同反应液一起置于37°C水浴中准确反应20min，立即取出擦干340nm下测定20min10s时的吸光值A2。分别记为A1测定、A1空白、A2测定、A2空白，计算ΔA测定=A1测定-A2测定，ΔA空白=A1空白-A2空白，ΔA=AA测定-AA空白，(空白管只需做1-2次)。

三、HMGR活性计算

(1) 按照蛋白浓度计算

酶活定义：在37°C条件下，每毫克蛋白在反应体系中每分钟消耗1nmol NADPH定义为一个酶活性单位。

$$\text{HMGR 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 32.154 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times F$$

(2) 按照样本质量计算

酶活定义：在37°C条件下，每克组织在反应体系中每分钟消耗1nmol NADPH定义为一个酶活性单位。

$$\text{HMGR活性(U/g质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提}}) \div T \times F = 32.154 \times \Delta A \div W \times F$$

V反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} L； ϵ ：NADPH摩尔吸光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；V样本：加入样本体积，0.25mL；
d：微量石英比色皿光径，1cm；V提取：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；
 10^9 :单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ ；T：反应时间，20min；F：稀释倍数。

注意事项：

1. 若样本ΔA 过低，建议增大样本量，同时减小试剂一体积后测定，注意同步修改计算公式。
2. 若反应液浑浊，建议用蒸馏水稀释样本后进行测定。

实验实例：

1. 取 0.1027g 番茄，加 1mL 提取液进行样本处理，离心取上清用蒸馏水稀释 2 倍后，按测定步骤操作，用 1mL 石英比色皿测得计算ΔA 测定=A1 测定-A2 测定=1.189-1.060=0.127，ΔA 空白=A1 空白-A2 空白=0.759-0.708=0.051，ΔA=ΔA 测定-ΔA 空白=0.127-0.051=0.078，按照样本质量计算：
HMGR活性(U/g 质量)= $32.154 \times \Delta A \div W \times F = 24.42$ U/g 质量。
2. 取 0.1007g 绿萝叶片，加 1mL 提取液进行样本处理，离心取上清用蒸馏水稀释 4 倍后，按测定步骤操作，用 1mL 石英比色皿测得计算ΔA 测定=A1 测定-A2 测定=1.375-1.289=0.086，ΔA 空白=A1 空白-A2 空白=0.759-0.708=0.051，ΔA=ΔA 测定-ΔA 空白=0.086-0.051=0.035，按照样本质量计算：
HMGR 活性(U/g 质量)= $32.154 \times \Delta A \div W \times F = 44.70$ U/g 质量。



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