

细胞HMG-CoA还原酶(HMGR)活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA3486

产品规格：100T/96S

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 Reductase, 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分子NADPH生成3-甲基-3,5-二羟戊酸(甲羟戊酸)和2分子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。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体110mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体0.6mL×2支	-20℃
试剂一	液体13mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体2.2mL×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2.5mL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:试剂三=110μL:20μL:20μL(共150μL, 约1T)配制成工作液使用，现配现用。

所需的设备和材料：

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅/金属浴、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔UV板、细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本提取：（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 细胞样本：先收集细胞到离心管中，离心后弃上清，按照细胞数量(10⁶个)：提取液体积(mL)为10~20的比例(建议10×10⁶细胞，加入1mL提取液)，超声破碎细胞(冰浴，功率200W，超声3s，间隔10s，共3min)，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/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计用蒸馏水调零。
2. 临用前将工作液常温平衡5min。
3. 操作表(在微量石英比色皿/96孔UV板中加入以下试剂)：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本	50	-
蒸馏水	-	50



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

工作液	150	150
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(酶标仪有控温功能的可以将温度设置为 37°C)，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， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白，(空白管只需做 1-2 次)。		

三、HMGR 活性计算

A、按微量玻璃比色皿计算

(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) 按照细胞数量计算

酶活定义：在 37°C 条件下，每 10^6 个细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{HMGR 活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{N} \times V \text{ 样} \div V \text{ 提}) \div T \times F = 32.154 \times \Delta A \div \text{N} \times F$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} 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，0.05mL；d：微量石英比色皿光径，1cm；V 提取：加入提取液体积，1mL；N：细胞或细菌总数，以百万计； 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。

B、按 96 孔板计算

(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。

$$\text{HMGR 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \times F = 53.59 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times F$$

(2) 按照细胞数量计算

酶活定义：在 37°C 条件下，每 10^6 个细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。HMGR 活性 (U/10⁶ cell) = [ΔA × V 反总 ÷ (ε × d) × 10⁹] ÷ (N × V 样 ÷ V 提) ÷ T × F = 53.59 × ΔA ÷ N × F

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} 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，0.05mL；d：96 孔 UV 板光径，0.6cm；V 提取：加入提取液体积，1mL；N：细胞或细菌总数，以百万计； 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，建议增大样本量后测定，注意同步修改计算公式。

实验实例：

1. 取 10×10^6 个 THP-1 细胞，加 1mL 提取液进行样本处理，离心取上清后按测定步骤操作，用 96 孔 UV 板测得计算 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定=0.856-0.810=0.046， ΔA 空白=A1 空白-A2 空白=0.791-0.754=0.037， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白=0.046-0.037=0.009，按照细胞数量计算：

$$\text{HMGR 活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = 53.59 \times \Delta A \div \text{N} \times F = 0.048 \text{ U/10}^6 \text{ cell}$$

2. 取 10×10^6 个 U937 细胞，加 1mL 提取液进行样本处理，离心取上清后，按测定步骤操作，用 96 孔 UV 板测得计算 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定=0.863-0.803=0.060， ΔA 空白=A1 空白-A2 空白=0.791-0.754=0.037， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白=0.060-0.037=0.023，按照细胞数量计算：

$$\text{HMGR 活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = 53.59 \times \Delta A \div \text{N} \times F = 0.123 \text{ U/10}^6 \text{ cell}$$



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