

# 细胞HMG-CoA还原酶(HMGR)活性检测试剂盒

## (可见分光光度法)

产品货号: BA3485

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 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<sup>+</sup>, 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60mL×1瓶	2-8°C
提取液二	液体0.6mL×1支	-20°C
试剂一	液体35mL×1瓶	2-8°C
试剂二	液体6mL×1瓶	2-8°C
试剂三	粉剂×1瓶	-20°C

### 溶液的配制:

1. 提取液二: -20°C 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°C 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=550μL:100μL:100μL(共 750μL, 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、水浴锅/金属浴、台式离心机、可调式移液器、1mL石英比色皿、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(10<sup>6</sup>个): 提取液体积(mL)为 10~20 的比例(建议 10×10<sup>6</sup> 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°C, 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. 临用前将工作液常温平衡 5min。
3. 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

Q Q: 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, 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  $\Delta A$  测定 = A1 测定 - A2 测定,  $\Delta A$  空白 = A1 空白 - A2 空白,  $\Delta A = \Delta A$  测定 -  $\Delta A$  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) 按照细胞数量计算

酶活定义: 在 37°C 条件下, 每 10<sup>6</sup> 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, 1×10<sup>-3</sup>L;  $\epsilon$ : NADPH 摩尔吸光系数, 6.22×10<sup>3</sup>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; N: 细胞或细菌总数, 以百万计; 10<sup>9</sup>: 单位换算系数, 1mol=10<sup>9</sup>nmol; T: 反应时间, 20min; F: 稀释倍数。

#### 注意事项:

1. 若样本  $\Delta A$  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<sup>6</sup> 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 1mL 石英比色皿测得计算  $\Delta A$  测定 = A1 测定 - A2 测定 = 0.801 - 0.737 = 0.064,  $\Delta A$  空白 = A1 空白 - A2 空白 = 0.759 - 0.708 = 0.051,  $\Delta A = \Delta A$  测定 -  $\Delta A$  空白 = 0.064 - 0.051 = 0.013, 按照细胞数量计算:

$$\text{HMGR 活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = 32.154 \times \Delta A \div \text{N} \times F = 0.042 \text{ U/10}^6 \text{ cell}$$

2. 取 10×10<sup>6</sup> 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 1mL 石英比色皿测得计算  $\Delta A$  测定 = A1 测定 - A2 测定 = 0.852 - 0.757 = 0.095,  $\Delta A$  空白 = A1 空白 - A2 空白 = 0.759 - 0.708 = 0.051,  $\Delta A = \Delta A$  测定 -  $\Delta A$  空白 = 0.095 - 0.051 = 0.044, 按照细胞数量计算:

$$\text{HMGR 活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = 32.154 \times \Delta A \div \text{N} \times F = 0.141 \text{ U/10}^6 \text{ cell}$$



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