

羟甲基戊二酰辅酶A合成酶（HMGCS）试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

羟甲基戊二酰辅酶A合成酶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。

测定原理

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。

所需的仪器和用品

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。

试剂的组成和配制

提取液：100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：粉剂×1瓶，-20℃避光保存；临用前加入3mL蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

试剂二：粉剂×1瓶，-20℃避光保存；临用前加入3mL蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

试剂三：6mL×1瓶，4℃避光保存。

样本测定的准备

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（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入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）：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℃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

1. 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。
2. 在微量石英比色皿或96孔板中加入25μL试剂一、25μL试剂二和50μL试剂三，混匀，加入100μL样本上清，迅速混匀后记录412nm下初始吸光值A1和4min后的吸光值A2。计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

HMGCS活性计算

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1nmolTNB为一个酶活力单位。

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

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1nmolTNB为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 36.76 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织每分钟催化产生1nmolTNB为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 36.76 \times \Delta A \div W$$

(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1nmolTNB为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min /104 cel)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.074 \times \Delta A$$

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，0.1 mL；V样总：加入提取液体积，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。

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1nmolTNB为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min /mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 73.53 \times \Delta A$$

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1nmolTNB为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 73.53 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织每分钟催化产生1nmolTNB为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 73.53 \times \Delta A \div W$$

(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1nmolTNB为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (nmol/min /104 cel)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.147 \times \Delta A$$

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：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.1 mL；V样总：加入提取液体积，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。