

羟甲基戊二酰辅酶A合成酶（HMGCS）活性检测试剂盒 （微量法）

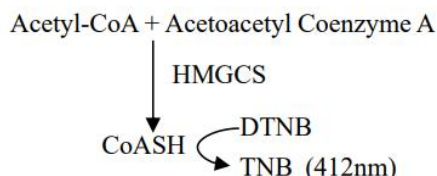
产品货号：BA2192

产品规格：100T/96S

产品简介：

羟甲基戊二酰辅酶A合成酶是一个非常关键的代谢途径，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℃
试剂一	粉剂×1支	-20℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	液体6mL×1瓶	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂一：临用前加入1mL蒸馏水充分溶解。-20℃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℃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90T）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℃离心10min，取上清，置冰上待测。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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℃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℃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℃水浴或恒温培养箱20min(酶标仪有控温功能可将温度调至37℃),拿出后迅速擦干并测定20min10s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。

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

(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

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com