

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 (10^4 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 25 μ L 试剂一、25 μ L 试剂二和 50 μ L 试剂三, 混匀, 加入 100 μ L 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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

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。

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

(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。

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

(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。

$$\text{HMGCS}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cel}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.074 \times \Delta A$$

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。

$$\text{HMGCS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 73.53 \times \Delta A$$

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。

$$\text{HMGCS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 73.53 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{HMGCS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 73.53 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{HMGCS}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cel}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.147 \times \Delta A$$

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。