

羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 (HMGCS) 检测试剂盒 (微量法)

货号：PMK1118

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞和细菌、血清（浆）或其他液体

产品简介

甲羟戊酸途径 (Mevalonate pathway) 是以乙酰辅酶 A 为原料合成异戊二烯焦磷酸和二甲烯丙基焦磷酸的一条代谢途径，存在于所有高等真核生物和很多病毒中。甲羟戊酸途径是一个非常重要的代谢途径，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。本试剂盒提供了一种简单、方便、快速的 HMGCS 活性检测方法，其原理是 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。通过检测 412nm 吸光度的变化计算样本中 HMGCS 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃ 避光保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃ 避光保存
试剂三	3mL	6mL	4℃ 避光保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 412nm 处的吸光度）

96 孔板或微量比色皿、可调节式移液枪及枪头

恒温箱、制冰机，低温离心机

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；使用前预冷；4℃ 保存。

试剂一：临用前 48T 加入 1.5mL 去离子水，96T 加入 3mL 去离子水充分溶解待用；用不完的试剂分装后 -20℃ 保存，避免反复冻融。

试剂二：临用前 48T 加入 1.5mL 去离子水，96T 加入 3mL 去离子水充分溶解待用；用不完的试剂分装后 -20℃ 保存，避免反复冻融。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 避光保存。

样本制备

动植物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 预冷的提取液，冰浴匀浆，8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

细胞和细菌样本：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，低速 600g 离心 5min，弃上清液，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎 5min（功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血浆、血清等液体样本样本：直接检测。

产品说明书

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在-80℃下保存一个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用BCA蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 412nm。分光光度计去离子水调零。
2. 根据样本量取部分试剂一、试剂二、试剂三于 37℃ 预热 10min。
3. 在 96 孔板或微量比色皿中依次加入 25 μL 试剂一、25 μL 试剂二和 50 μL 试剂三，混匀，加入 100 μL 样本上清，迅速混匀后记录 412nm 下初始吸光值 A_1 ，迅速置于 37℃ 恒温箱中孵育 4min 后取出记录吸光值 A_2 。计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注意：1. 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 ΔA 小于 0.001 可适当加大样本量；如果 ΔA 大于 0.6，可用提取液稀释样品，计算时结果乘以稀释倍数。

2. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4-8 个样本），不推荐同时测多个样本。

结果计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式

1. 按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1nmolTNB 为一个酶活力单位。

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

2. 按细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细胞在反应体系中每分钟催化产生 1nmolTNB 为一个酶活力单位。

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

3. 按液体样本体积计算：

单位定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟催化产生 1nmolTNB 为一个酶活力单位。

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

4. 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1nmolTNB 为一个酶活力单位。

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

$V_{\text{反应}}$ ：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 ：0.5 cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.1mL； T ：反应时间，4min； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； W ：样品质量，g；500：细胞总数，500 万； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL。

B. 使用微量比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d :0.5cm 调整为 d :1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

- PMK1005 柠檬酸合酶(CS)检测试剂盒(微量法)
- PMK1107 α 酮戊二酸脱氢酶(α -KGDH)检测试剂盒(微量法)
- PMK1109 琥珀酸脱氢酶(SDH)检测试剂盒(微量法)
- PMK1114 线粒体苹果酸脱氢酶(MDHm)检测试剂盒(微量法)
- PMK1115 乳酸(LA)检测试剂盒(微量法)
- PMK1116 丙酮酸(PA)检测试剂盒(微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

