

## 羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶（HMGCS）检测试剂盒（分光光度法）

**注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**

### 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。

### 试剂组成和配制：

提取液：60mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存；临用前加入 7mL 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 7mL 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；

试剂三：15mL×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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 412nm，蒸馏水调零。

2、在 1 mL 玻璃比色皿中加入 125μL 试剂一、125μL 试剂二和 250μL 试剂三，混匀，加入 500μL 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：

### 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。

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

### 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。

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

#### (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。

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

#### (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。

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

V 反总：反应体系总体积， $1 \times 10^{-3}$  L；

$\epsilon$ ：TNB 摩尔消光系数， $1.36 \times 10^4$  L / mol /cm；

d：比色皿光径，1cm；

V 样：加入样本体积，0.5 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。