

## 羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 (HMGCS) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂的组成和配制

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 125 $\mu$ L 试剂一、125 $\mu$ L 试剂二和 250 $\mu$ L 试剂三，混匀，加入 500 $\mu$ 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

#### 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。

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

##### (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。

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

(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。

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

$V_{\text{反总}}$ : 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;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.5 mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $T$ : 反应时间, 4 min;  $C_{\text{pr}}$ : 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。