

CheKine™ 羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 (HMGCS) 活性检测试剂盒 (微量法)

Cat #: KTB3028

Size: 48 T/48 S 96 T/96 S

	羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 (HMGCS) 活性检测试剂盒 (微量法)		
REF	货号: KTB3028	LOT	批号: 见产品标签
	适用样本: 动植物组织、细胞或细菌、真菌、血清 (浆) 或其他液体		
	保质期: -20°C, 避光保存 6 个月		

原理

甲羟戊酸途径是一个非常重要的代谢途径, 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 (HMGCS) 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。CheKine™ 羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 (HMGCS) 活性检测试剂盒 (微量法) 可检测动植物组织、细胞或细菌、真菌、血清 (浆) 或其他液体等生物样本。在该试剂盒中, 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 412 nm 下有特征吸光值。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	60 mL×2	4°C
Reagent I	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20°C, 避光保存
Reagent II	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20°C, 避光保存
Reagent III	3 mL	6 mL	4°C, 避光保存

注意: 正式检测前, 建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。

自备耗材

- 酶标仪或可见分光光度计 (能测 412 nm 处的吸光度)
- 96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头、1.5 mL 离心管
- 恒温箱、制冰机、低温离心机
- 去离子水
- 匀浆器或研钵 (如果是组织样本)

试剂准备

Extraction Buffer: 即用型；使用前，平衡到室温。4℃保存。

Working Reagent I: 临用前配制；48 T 加入 1.5 mL 去离子水，96 T 加入 3 mL 去离子水，充分溶解，用不完的试剂-20℃避光分装保存 1 个月，避免反复冻融。

Working Reagent II: 临用前配制；48 T 加入 1.5 mL 去离子水，96 T 加入 3 mL 去离子水，充分溶解，用不完的试剂-20℃避光分装保存 1 个月，避免反复冻融。

Reagent III: 即用型；使用前，平衡到室温。4℃避光保存。

样本制备

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。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。

1. 组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，用匀浆器或研钵冰浴匀浆，8,000 g，4℃离心 10 min，取上清液待测。

2. 细菌、细胞或真菌：收集 500 万细菌、细胞或真菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细菌、细胞或真菌，离心后弃上清，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴超声波破碎细菌、细胞或真菌 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），8,000 g，4℃离心 10 min，取上清液待测。

3. 血清（浆）或其他液体：直接检测。

注意：如需测定蛋白浓度，推荐使用 Abbkine 货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 412 nm，可见光分光光度计用去离子水调零。

2. 操作表（下述操作在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次操作）：

试剂	空白孔 (μL)	测定孔 (μL)
Working Reagent I	25	25
Working Reagent II	25	25
Reagent III	50	50
Extraction Buffer	100	0
样本	0	100

3. 加入样本后迅速混匀，立即记录 10s 时 412 nm 处吸光值 A₁ 和 25℃孵育 4 min 10 s 时 412 nm 处吸光值 A₂，空白孔记为 A_{空白}，测定孔记为 A_{测定}。计算 $\Delta A_{测定} = A_{2测定} - A_{1测定}$ ， $\Delta A_{空白} = A_{2空白} - A_{1空白}$ ， $\Delta A = \Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}$ 。

注意：空白孔只需做 1-2 次。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 0.01 可适当加大样本量或延长反应时间（不超过 8 min）。如果 ΔA 大于 0.6，样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

注意：我们为您提供的计算公式，包括推导过程计算公式和简洁计算公式。两者完全相等。建议以加粗的简洁计算公式为最终计算公式。

HMGCS 活性的计算

A. 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算：

酶活单位定义：每毫克蛋白每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算：

酶活单位定义：每克样本每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。



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

(3) 按细胞、细菌或真菌数量计算：

酶活单位定义：每 10⁶ 个细胞、细菌或真菌每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HMGCS (U/10}^6\text{)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (n \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 73.53 \times \Delta A \div n$$

(4) 按液体体积计算：

酶活单位定义：每毫升液体每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

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

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.2 mL=0.0002 L； ϵ ：TNB 摩尔消光系数，1.36×10⁴ L/mol/cm； d ：96 孔板光径，0.5 cm；10⁹：1 mol=1×10⁹ nmol； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.1 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入 Extraction Buffer 体积，1 mL； T ：反应时间，4 min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g； n ：细胞、细菌或真菌数量，以百万计。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

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

结果展示

以下数据仅供参考，实验者需根据自己的实验对样品进行检测。

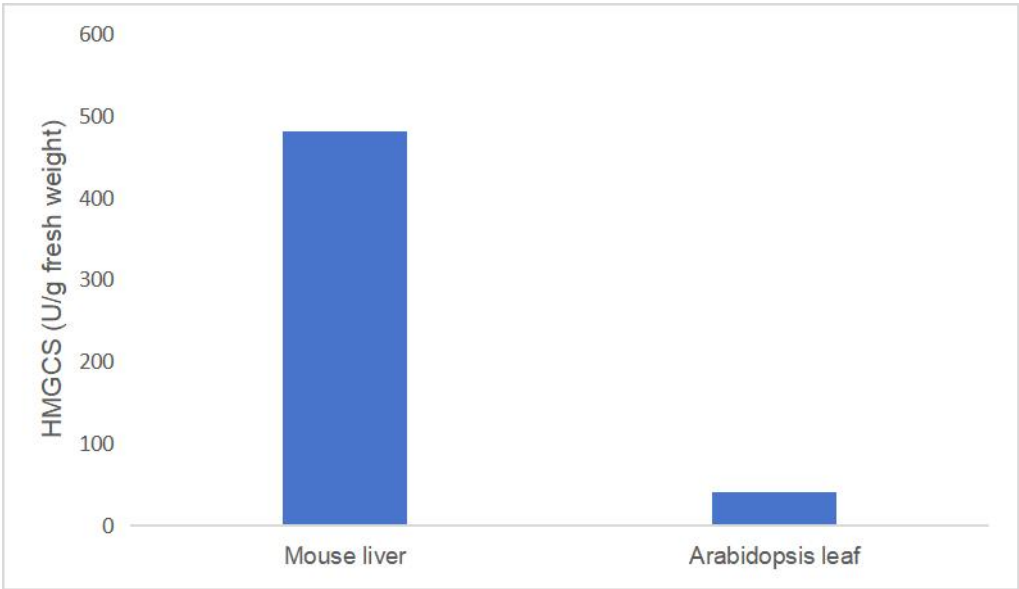


Figure 1. 本试剂盒测定小鼠肝脏和拟南芥叶中 HMGCS 的含量

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTB1410	CheKine™ 谷丙转氨酶（ALT/GPT）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1420	CheKine™ 谷草转氨酶（AST/GOT）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1430	CheKine™ 脯氨酸（PRO）含量检测试剂盒（微量法）

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

