



肉毒碱棕榈酰转移酶活性检测试剂盒

CPT-1 Assay Kit

微量法

产品编号: AK491M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK491-A	100mL×1 瓶	-20℃保存;
AK491-B	20mL×1 瓶	-20℃保存;
AK491-C	1.5mL×1 支	-20℃保存;
AK491-D	30mL×1 瓶	4℃保存;
AK491-E	粉剂×1 瓶	4℃保存;
AK491-F	粉剂×1 支	-20℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 肉毒碱棕榈酰转移酶 (Carnitine palmitoyltransferase, CPT-1) 是存在于线粒体内膜的一类酰基转移酶。可逆地催化从酰基辅酶 A 将酰基转移至 L-肉毒碱的反应, 在转运脂肪酸通过线粒体内膜的过程中起重要作用。

原理: 基于肉碱和脂酰辅酶 A 在丙二酰辅酶 A 存在与否的条件下, 通过肉碱脂酰转移酶(CPT-I)的作用, 产生脂酰肉碱, 并释放出巯基辅酶 A(COA-SH), 与 Ellman 试剂 DN-TB 反应后, 产生黄色的 TNB。通过其吸收峰值得变化 (412nm), 来定量分析 CPT-1 的活性。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰、无水乙醇和蒸馏水。

样本的前处理:

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离:

1. 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞, 加入 1mL AK491-A 和 10uL AK491-C, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆液于 600g, 4℃离心 5min。
3. 弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4℃离心 10min。
4. 上清液即胞浆提取物, 可用于测定从线粒体泄漏的 CPT-1 (此步可选做)。
5. 在步骤 4 的沉淀中加入 200uL AK491-B 和 2uL AK491-C, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3 秒, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于线粒体 CPT-1 测定。

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. 试剂配制:
 - (1) 在 AK491-E 中加入 1mL 无水乙醇, 混匀, 再加入 22mL AK491-D, 混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 5min; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融;
 - (2) 在 AK491-F 中加入 1mL 蒸馏水, 混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 5min; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融;
3. 样本测定 (在微量石英比色皿或 96 孔板中加入)

试剂名称	测定管 (ul)
样品	10
AK491-E	220
AK491-F	10
混匀，记录 412nm 处 20 秒时的初始吸光度 A1 和 2 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

CPT-1 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 880 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 177.8 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.3556 \times \Delta A$$

注：V 反总：反应体系总体积， 2.4×10^{-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，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，2 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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1760 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 355.6 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.711 \times \Delta A$$

注：V 反总：反应体系总体积， 2.4×10^{-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，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，2 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。