



微信公众号

400-901-9800

sales@bioss.com.cn

techsupport@bioss.com.cn

## 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、微量玻璃比色皿/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（在微量玻璃比色皿或 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。

$$CPT-1 (\text{U/mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 880 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

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

(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。

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

**注：**  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $2.4 \times 10^{-4}$  L;  $\varepsilon$ : 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, 0.01 mL;  $V_{\text{总}}$ : 加入提取液体积, 0.202 mL;  $T$ : 反应时间, 2 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。

##### 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。

$$CPT-1 (\text{U/mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1760 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

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

(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。

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

**注：**  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $2.4 \times 10^{-4}$  L;  $\varepsilon$ : TNB 摩尔消光系数,  $1.36 \times 10^4$  L / mol / cm;  $d$ : 96 孔板光径, 0.5cm;

$V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.01 mL;  $V_{\text{总}}$ : 加入提取液体积, 0.202 mL;  $T$ : 反应时间, 2 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。

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