

肉毒碱棕榈酰转移酶（CPT-I）试剂盒说明书

（货号： ADS-W-ZF028 微板法 96 样）

一、产品简介：

肉毒碱棕榈酰转移酶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。

肉碱脂酰转移酶(CPT-I)催化肉碱和脂酰辅酶 A 在丙二酰辅酶 A 存在与否的条件下,生成 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,通过测定 412nm 处的光吸收,来计算出 CPT-I 活性。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 1mL×1 支	4℃保存	
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前在试剂五中加入 1mL 无水乙醇,混匀后加入 22mL 试剂四,混匀,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融。
试剂六	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前在试剂六中加入 1mL 蒸馏水,混匀,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、研钵、冰、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅。

四、肉毒碱棕榈酰转移酶（CPT-I）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备：

(1) 组织样本：

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌/细胞,加入 1mL 试剂一,用冰浴匀浆器或研钵匀浆,转移至离心管后于 4℃×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀,上清液移至另一离心管中,4℃×12000g 离心 10min。沉淀即为提取的线粒体,用作第④步操作。
- ③ (选做) 上步得到的上清液即为胞浆提取物,可作为样本用于测定从线粒体泄漏的 CPT-1,用于判断线粒体提取效果。
- ④ 在沉淀(线粒体)中加入 200μL 试剂二和 2μL 试剂三,超声波破碎(冰浴,功率 20%或 200W,超声 3s,间隔 10 秒,重复 30 次),液体置于冰上用于 CPT-1 酶活性测定。

【注】：若增加样本量,可按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取,或按照细菌/细胞数量(10^4)：提取液(mL)为 500~1000：1 的比例进行提取。。

(2) 液体样本：直接测定。若浑浊,离心后取上清检测。

2、上机检测：

- ① 打开酶标仪,设置温度 25℃,调节波长到 412 nm。
- ② 试剂一在 25℃水浴锅中预热 30 min。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂五	220
试剂六	10
轻轻混匀, 25°C条件下, 于 412nm 处检测, 分别于 20s 和 2min20s 读取吸光值 A1 和 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】1.若 ΔA 值小于 0.01, 可增加 V1 的加入量 (例如样本加入 20uL, 试剂五相应少加 10uL), 也可适当延长反应时间 T (如由 2min20s 延长到 5min20s 或更长时间读取 A2)。或适当加大样本量 W (如由 0.1g 增至 0.2g, 试剂量不变), 则改变后的 V1、T 和 W 需代入公式重新计算。

2. 若起始值 A 太大如超过 2 (如上清液为黄色的样本或活性较大的样本, 则起始值相对会偏高), 上清液颜色深可对叶片进行除色素处理或适当减少样本加样量 V1 (如由 10μL 减至 5μL, 则额外加入 5uL 纯水), 则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按蛋白浓度计算:

活性定义: 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。

$$\text{CPT-I (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 1760 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算:

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

$$\text{CPT-I (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 355.6 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌或细胞数量计算:

活性定义: 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。

$$\text{CPT-I (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.711 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算:

活性定义: 每 mL 样本每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-I (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \div V) \div T = 355.6 \times \Delta A$$

ϵ ---TNB 摩尔消光系数, $1.36 \times 10^4 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

V---加入提取液体积, 0.202 mL;

V1---加入样本体积, $10 \mu\text{L} = 0.01 \text{ mL}$;

V2---反应体系总体积, $220 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

W---样品质量, g;

T---反应时间, 2min;

Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

500---细胞或细菌总数, 500 万