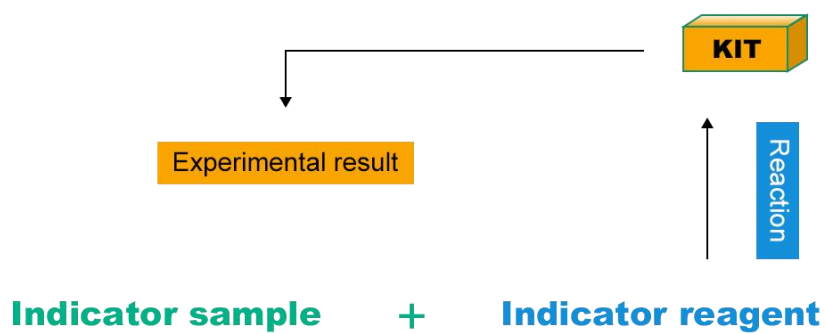


上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S1113

Size: 100T/96S

## 肉毒碱棕榈酰转移酶 (CPT-1) 检测试剂盒说明书

### 微量法

\*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 一、测定意义：

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。

#### 二、测定原理：

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。

#### 三、需自备的仪器和用品：

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

#### 四、试剂的组成和配置：

| 种类  | 试剂规格           | 储存条件   | 使用方法及注意事项 |
|-----|----------------|--------|-----------|
| 试剂一 | 液体 100mL × 1 瓶 | -20℃保存 |           |
| 试剂二 | 液体 20mL × 1 瓶  | -20℃保存 |           |
| 试剂三 | 液体 1.5mL × 1 支 | -20℃保存 |           |
| 试剂四 | 液体 30mL × 1 瓶  | 4℃保存   |           |
| 试剂五 | 粉剂 × 1 瓶       | 4℃保存   |           |
| 试剂六 | 粉剂 × 1 支       | -20℃保存 |           |

## 五、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 试剂一和 10uL 试剂三，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 试剂二和 2uL 试剂三，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。

## 六、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、样本测定

- (1) 在试剂五中加入 1mL 无水乙醇，混匀，再加入 22mL 试剂四，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) 在试剂六中加入 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) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μL 样本、220 μL 试剂五和 10 μL 试剂六，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  $\Delta A = A2 - A1$ 。

## 七、CPT-1 活性计算：

- 使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。

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

$$= 0.3556 \times \Delta A$$

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

● 使用 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。

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

$V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $2.4 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : 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;  $V_{\text{样总}}$ : 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。