

## 肉毒碱棕榈酰转移酶 I (CPT-1)活性试剂盒

规格：微量法 96 样

检测原理：DTNB 比色法

编号：ml301015

检测波长：412nm

### 注意：

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义：

肉毒碱棕榈酰基转移酶 (Carnitinepalmitoyl transferase, CPT; EC 2.3.1.21) 分为 CPT-I 和 CPT-II 两类。CPT-I 是脂肪酸 $\beta$ 氧化过程中的限速酶，位于线粒体外膜，催化长链脂肪酸从酰基辅酶 A 转移到肉毒碱上，进而从胞浆进入线粒体内部，并且进一步在位于线粒体内膜上的 CPT-II 催化下进行 $\beta$ 氧化。肉毒碱棕榈酰转移酶的功能异常可能导致脂肪酸代谢紊乱，进而引起一系列的代谢性疾病。

### 测定原理：

肉碱和棕榈酰辅酶 A 在肉碱脂酰转移酶 (CPT-I) 的作用下，产生脂酰肉碱，并释放出游离辅酶 A (COA-SH)，与 Ellman 试剂 DTNB 反应后，产生黄色的 TNB。通过其吸收峰值的变化 (412nm)，来计算 CPT-I 的活性。

需自备的仪器和用品：

### 自备仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰、水浴锅和蒸馏水。

### 试剂的组成：

提取液 A: 液体 110mL×1 瓶, -20°C保存;

提取液 B: 液体 22mL×1 瓶, -20°C保存;

提取液 C: 液体 0.6mL×3 支, -20°C避光保存;

试剂一: 液体 12mL×1 瓶, -20°C避光保存;

试剂二: 液体 12mL×1 瓶, -20°C避光保存;

试剂三: 液体 4mL×1 瓶, -20°C避光保存。

### 样本提取:

#### 组织、细菌或细胞:

- 1、准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细胞, 加入 1mL 提取液 A 和 10uL 提取液 C, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆 600g, 4°C离心 5min。
- 3、弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4°C离心 10min。
- 4、上一步结果得到的上清液即胞浆提取物, 可用于测定从线粒体泄漏的 CPT- I (此步可选做, 可以判断线粒体提取效果)。
- 5、步骤 3 中的沉淀即为线粒体, 加入 200uL 提取液 B 和 2uL 提取液 C, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于 CPT- I 酶活性测定, 余留约 50μL 用于蛋白浓度测定(测定蛋白浓度使用 BCA 法)。

### 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、所有试剂平衡至室温 (25°C)。
- 3、在 96 孔板中依次加入:

| 试剂名称(μL) | 测定管 |
|----------|-----|
| 样本       | 10  |
| 试剂一      | 100 |
| 试剂二      | 100 |
| 试剂三      | 30  |

混匀，立即在 412nm 下读取吸光值 A1,读取 A1 后立即 37°C准确孵育 5min 在 412nm 下读取吸光值 A2,  $\Delta A=A2-A1$ 。

**注意：如果测定管 $\Delta A$  大于 0.3 则需要对样本进行稀释，稀释倍数带入计算公式。如果测定管 $\Delta A$  小于 0.01，则需要增加样本量。**

### 结果计算：

#### (1) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  TNB 定义为一个酶活单位。

$$\text{CPT- I 活性 (U/g 鲜重)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反}} \times 10^6 \div V_{\text{样反}} \times V_{\text{样总}} \div W \div T$$

#### (2) 按细菌或细胞密度计算

单位定义：每  $10^7$ 个细菌或细胞每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  TNB 定义为一个酶活单位。

$$\text{CPT- I 活性 (U/}10^7 \text{ cell)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反}} \times 10^6 \div V_{\text{样反}} \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量} \div T$$

#### (3) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  TNB 定义为一个酶活单位。

$$\text{CPT- I 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反}} \times 10^6 \div V_{\text{样反}} \div \text{Cpr} \div T$$

$\epsilon$ : TNB 摩尔消光系数, 13600 L/mol/cm;

d: 光径, 0.68 cm;

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

106:  $1\text{mol} = 10^6\mu\text{mol}$ ;

$V_{\text{样反}}$ : 样本在反应体系中的体积, 0.01mL;

$V_{\text{样总}}$ : 样本提取后的总体积, 0.202mL;

W: 样本质量, g;

T: 反应时间, 5min;

细胞数量: 以百万计;

Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL。

#### 预实验的意义:

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达处理的样本) ;
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;
- 5、通过 3 - 5 组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。