

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：JLC_K14904

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 β 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 β 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。

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℃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℃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℃）。
- 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℃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 ΔA 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 ΔA 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 μmol TNB定义为一个酶活单位。

CPT- I 活性 (U/g 鲜重) = $\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反}} \times 106 \div V_{\text{样反}} \times V_{\text{样总}} \div W \div T$

(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 μmol TNB定义为一个酶活单位。

CPT- I 活性 (U/ 10^7 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 μmol TNB定义为一个酶活单位。

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

ϵ : 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, 2.4×10^{-4} 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;

C_{pr} : 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适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。