

使用说明书

Instruction Manual

肉毒碱棕榈酰转移酶活性检测试剂盒（微量法）

CPT-1 Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0055M-A	100mL×1 瓶	-20℃保存
CB0055M-B	20mL×1 瓶	-20℃保存
CB0055M-C	1.5mL×1 支	-20℃保存
CB0055M-D	30mL×1 瓶	4℃保存
CB0055M-E	粉剂×1 瓶	4℃保存
CB0055M-F	粉剂×1 支	-20℃保存

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/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。

二、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：

- 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL CB0055M-A 和 10μL CB0055M-C，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 将匀浆液于 600g，4℃离心 5min。
- 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心 10min。
- 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）。
- 在步骤 4 的沉淀中加入 200μL CB0055M-B 和 2μL CB0055M-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。

三、测定步骤：

- 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。
- 试剂配制：

(1) 在 CB0055M-E 中加入 1mL 无水乙醇，混匀，再加入 22mL CB0055M-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 CB0055M-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（在微量石英比色皿或 96 孔板中加入）：

试剂名称	测定管 (μL)
样品	10
CB0055M-E	220
CB0055M-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 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

四、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（此法需自行测定 Cpr）：

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。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 880 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

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

注： V 反总：反应体系总体积，2.4×10⁻⁴ L；ε：TNB 摩尔消光系数，1.36×10⁴ L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，2 min；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。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算（此法需自行测定 Cpr）：

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。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1760 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

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

注： V 反总：反应体系总体积，2.4×10⁻⁴ L；ε：TNB 摩尔消光系数，1.36×10⁴ L / mol /cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，2 min；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。

注意事项

1. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

