肉毒碱棕榈酰转移酶活性检测试剂盒

CPT-1 Assay Kit

分光光度法

产品编号：AK491V

产品规格：50T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK491-A	50mL×1 瓶	-20℃保存；
AK491-B	10mL×1 瓶	-20℃保存；
AK491-C	1mL×1 支	-20℃保存；
AK491-D	55mL×1 瓶	4℃保存；
AK491-E	粉剂×1 瓶	4℃保存；
AK491-F	粉剂×1 支	-20℃保存；

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：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。

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。

自备用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿、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。

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 AK491-A 和 10uL AK491-C，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 AK491-B 和 2uL AK491-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。

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. 试剂配制：

   （1）在 AK491-E 中加入 2mL **无水乙醇**，混匀，再加入 44mL AK491-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 AK491-F 中加入 2mL 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 1mL 玻璃比色皿中加入）

试剂名称	测定管 (ul)

样品	40
AK491-E	880
AK491-F	40
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 ΔA=A2-A1。	

CPT-1 活性计算：

（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。

CPT-1 (nmol/min/mg prot) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T = 880×ΔA÷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。

CPT-1 (nmol/min/g 鲜重) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(W× V 样÷V 样总)÷T = 177.8×ΔA÷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。

CPT-1 (nmol/min/10^4 cell) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T = 0.3556×ΔA

注：V 反总：反应体系总体积，9.6×10^{-4} L；ε：TNB 摩尔消光系数，1.36×10^4 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.04 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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)