

肉毒碱棕榈酰转移酶（CPT-I）试剂盒说明书

(货号： BP10205W 微板法 96 样 有效期： 3 个月)

一、指标介绍：

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。

肉碱脂酰转移酶(CPT-I)催化肉碱和脂酰辅酶 A 在丙二酰辅酶 A 存在与否的条件下,生成 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,通过测定 412nm 处的光吸收,来计算出 CPT-I 活性。

二、试剂盒组分与配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 1mL×1 支	4℃避光保存	
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存	1. 临用前在试剂五中加入 1mL 无水乙醇,混匀后加入 22mL 试剂四,混匀, 2. 用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融。
试剂六	粉剂×1 支	-20℃保存	1. 临用前在试剂六中加入 1mL 蒸馏水,混匀; 2. 用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、无水乙醇、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

(1) 组织样本：

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌/细胞，加入 1mL 试剂一，用冰浴匀浆器或研钵匀浆，转移至离心管后于 4℃×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀，上清液移至另一离心管中，4℃×12000g 离心 10min。沉淀即为提取的线粒体，用作第④步操作。
- ③（选做）上步得到的上清液即为胞浆提取物，可作为样本用于测定从线粒体泄漏的 CPT-1，用于判断线粒体提取效果。
- ④ 在沉淀（线粒体）中加入 200μL 试剂二和 2μL 试剂三，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10 秒，重复 30 次），液体置于冰上用于 CPT-1 酶活性测定。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取，或按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。。

(2) 液体样本：直接测定。若浑浊，离心后取上清检测。

2、检测步骤：

- ① 打开酶标仪，设置温度 25℃，调节波长到 412 nm。
- ② 试剂在 25℃水浴锅中预热 30 min。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	10
试剂五	220
试剂六	10
轻轻混匀，25℃条件下，于 412nm 处检测，分别于 20s 和 2min20s 读取吸光值 A1 和 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】1.若 ΔA 值小于 0.01，可增加 V1 的加入量（例如样本加入 20uL，试剂五相应少加 10uL），也可适当延长反应时间 T（如由 2min20s 延长到 5min20s 或更长时间读取 A2）。或适当加大样本量 W（如由 0.1g 增至 0.2g，试剂量不变），则改变后的 V1、T 和 W 需代入公式重新计算。
2. 若起始值 A 太大如超过 2（如上清液为黄色的样本或活性较大的样本，则起始值相对会偏高），上清液颜色深可对叶片进行除色素处理或适当减少样本加样量 V1（如由 10μL 减至 5μL，则额外加入 5uL 纯水），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按蛋白浓度计算：

活性定义：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。

$$\text{CPT-I (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 1760 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算：

活性定义：每 g 组织每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-I (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 355.6 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌或细胞数量计算：

活性定义：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。

$$\text{CPT-I (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.711 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算：

活性定义：每 mL 样本每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-I (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \div V) \div T = 355.6 \times \Delta A$$

ϵ ---TNB 摩尔消光系数， $1.36 \times 10^4 \text{ L / mol / cm}$ ；

d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，0.202 mL；

V1---加入样本体积，10μL=0.01mL；

V2---反应体系总体积，220μL= 2×10^{-4} L；

W---样品质量，g；

T---反应时间，2min；

Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

500---细胞或细菌总数，500 万