

肉毒碱棕榈酰转移酶（CPT-1）试剂盒说明书

（货号：ADS-F-ZF028 紫外法 48 样）

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 1mL×1 支	4℃保存	
试剂四	液体 55mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前在试剂五中加入 2mL 无水乙醇，混匀后加入 44mL 试剂四，混匀，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	临用前在试剂六中加入 2mL 蒸馏水，混匀，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融

三、所需的仪器和用品：

分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、研钵、冰、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅。

四、肉毒碱棕榈酰转移酶（CPT-I）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

（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、上机检测：

- ① 分光光度计预热 30 min，设置温度 25℃，调节波长到 412nm，蒸馏水调零。
- ② 试剂一在 25℃水浴锅中预热 30 min。
- ③ 在 1mL 比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂五	880
试剂六	40
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 80uL，试剂五相应少加 40uL），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 40μL 减至 20μL，则额外加入 20uL 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。

$$\text{CPT-I (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 880 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{CPT-I (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 177.8 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{CPT-I (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.3556 \times \Delta A$$

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。

$$\text{CPT-I (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \div V) \div T = 177.8 \times \Delta A$$

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

d---96 孔板光径，1cm;

V---加入提取液体积，0.202 mL;

V1---加入样本体积，40μL=0.04mL;

V2---反应体系总体积，960μL=9.6×10⁻⁴ 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