

肉毒碱棕榈酰转移酶 (CPT1) 检测试剂盒 (微量法)

货号: PMK1153

保存: -20°C 避光保存 6 个月

规格: 48T/96T

适用样本: 动植物组织、细胞、真菌

产品简介

肉毒碱棕榈酰基转移酶 1(CPT1) 又称为肉碱脂酰转移酶, 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。本试剂盒可检测生物样本中 CPT1 活性, 其原理是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(CPT1) 的作用, 产生脂酰肉碱, 并释放出巯基辅酶 A(COA-SH), 与 Ellman 试剂 DNTB 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 CPT1 的活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
试剂一	50mL	100mL	4°C 保存
试剂二	10mL	20mL	4°C 保存
试剂三	1mL	2mL	4°C 避光保存
试剂四	15mL	30mL	4°C 保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4°C 保存
试剂六	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20°C 避光保存

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计 (能测 412nm 处的吸光度)

制冰机、低温离心机

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

去离子水、无水乙醇

匀浆器或研钵 (如果是组织样本)

试剂准备

试剂一: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂二: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂三: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 避光保存。

试剂四: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂五: 使用前 48T 加入 0.5mL 无水乙醇, 混匀, 再加入 11mL 试剂四, 混匀; 96T 加入 1mL 无水乙醇, 混匀, 再加入 22mL 试剂四, 混匀。37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 孵育 5min; 用不完的试剂分装后 -20°C 保存, 避免反复冻融。

试剂六: 使用前 48T 加入 0.5mL 去离子水, 混匀; 96T 加入 1mL 去离子水, 混匀。37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 孵育 5min; 用不完的试剂分装后 -20°C 保存, 避免反复冻融。

样本制备

组织、真菌菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离:

产品说明书

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万个细胞，加入 1mL 试剂一和 10 μ L 试剂三，冰浴匀浆；
2. 离心匀浆液，600g，5min，4 $^{\circ}$ C，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀；
3. 再次离心上清，11,000g，10min，4 $^{\circ}$ C，沉淀即为提取的线粒体，用作第 5 步操作；
4. (选做)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 CPT1 (此步可选做，可用于判断线粒体提取效果)；
5. 在沉淀中加入 200 μ L 试剂二和 2 μ L 试剂三，充分重悬沉淀，用于下一步 CPT1 酶活性检测。

注意：推荐使用新鲜样本，以保证酶的活力。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 412nm。分光光度计去离子水调零。
2. 样本测定：在 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入 10 μ L 样本、220 μ L 试剂五和 10 μ L 试剂六，混匀，记录 412nm 处 20 秒时的初始吸光度 A_1 和 2 分 20 秒时的吸光度 A_2 ，计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 ΔA 小于 0.001 可适当加大样本量。如果 ΔA 大于 0.6，样本可用试剂二进一步稀释（计算结果乘以稀释倍数），或减少提取用样本量。

结果计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式如下：

(1) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT1 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 356.5 \times \Delta A \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT1 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1765 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(3) 按真菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT1 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.713 \times \Delta A$$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， 2.4×10^{-4} L； ϵ ：TNB 摩尔消光系数， 1.36×10^4 L/mol/cm； d ：96 孔板光径，0.5cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，0.202 mL； T ：反应时间，2min； 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. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d :0.5cm 调整为 d :1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

- PMK1142 甘油三酯 (TG) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1143 总胆固醇 (TC) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1144 游离胆固醇 (FC) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1137 游离脂肪酸 (FFA) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1151 血清高密度脂蛋白 (HDL-C) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1152 血清低密度脂蛋白 (LDL-C) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

