

肉毒碱棕榈酰转移酶（CPT1）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1153

保存：-20℃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℃ 保存
试剂二	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂三	1mL	2mL	4℃ 避光保存
试剂四	15mL	30mL	4℃ 保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃ 保存
试剂六	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 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℃ 保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 避光保存。

试剂四：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 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℃（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，避免反复冻融。

试剂六：使用前每支加入 0.5mL 去离子水，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，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 10μL 试剂三，冰浴匀浆；
2. 离心匀浆液，600g，5min，4℃，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℃，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 200μL 试剂二和 2μL 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 μL 样本、220 μL 试剂五和 10 μL 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：

