

## 肉毒碱棕榈酰转移酶（CPT-1）试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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-1)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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰、无水乙醇和蒸馏水

试剂组成和配制：

试剂一：液体100mL×1瓶，-20℃保存；

试剂二：液体20mL×1瓶，-20℃保存；

试剂三：液体1.5mL×1支，-20℃保存；

试剂四：液体30mL×1瓶，4℃保存；

试剂五：粉剂×1瓶，4℃保存；

试剂六：粉剂×1支，-20℃保存；

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：

- 称取约0.1g组织或收集500万细胞，加入1mL试剂一和10μL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 将匀浆液于600g，4℃离心5min。
- 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心10min。
- 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）。
- 在步骤④的沉淀中加入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、样本测定

（1）在试剂五中加入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，禁止反复冻融；

（2）在试剂六中加入1mL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）在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本、220μL试剂五和10μL试剂六，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 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

CPT-1活性计算:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

(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。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 880 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 177.8 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.3556 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积,  $2.4 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : TNB摩尔消光系数,  $1.36 \times 10^4$  L / mol /cm; d: 比色皿光径, 1cm; V样: 加入样本体积, 0.01 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。

b. 使用96孔板测定的计算公式如下:

(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。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1760 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 355.6 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.711 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积,  $2.4 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : TNB摩尔消光系数,  $1.36 \times 10^4$  L / mol /cm; d: 96孔板光径, 0.5cm; V样: 加入样本体积, 0.01 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。

