肉毒碱棕榈酰转移酶（CPT-1）试剂盒说明书

可见分光光度法 50 管/24 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-I)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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰、无水乙醇和蒸馏水

试剂组成和配制：

试剂一：液体 60mL×1 瓶，-20℃保存；
试剂二：液体 10mL×1 瓶，-20℃保存；
试剂三：液体 1mL×1 支，-20℃保存；
试剂四：液体 55mL×1 瓶，4℃保存；
试剂五：粉剂×1 瓶，4℃保存；
试剂六：粉剂×1 瓶，4℃保存；
试剂七：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：

① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL 试剂一和 10uL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
② 将匀浆液于 600g，4℃离心 5min。
③ 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心 10min。
④ 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）。
⑤ 在步骤④的沉淀中加入 200uL 试剂二和 2uL 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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 412nm。

2、样本测定

（1）试剂五的配制：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）试剂六的配制：在试剂六中加入 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；

（3）在试剂七中加入 2.5mL 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；

（4）工作液配制

临用前，按照下表比例配制工作液

试剂名称（μL）	测定工作液	对照工作液
试剂五	880	
试剂六		880
试剂七	40	40

充分混匀，静置 5min 后使用，用多少配多少。

（5）96 孔板中加入下列试剂

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本上清	40	10
测定工作液	920	
对照工作液		920

37℃反应 30min，412nm 下检测吸光值 A 测定与 A 对照，ΔA=A 测定-A 对照。

CPT-1 活性计算：

（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。

CPT-1（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T=58.665×ΔA÷Cpr

（2）按样本鲜重计算

CPT-1（nmol/min/g 鲜重）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷（W ×V 样÷V 样总）÷T=11.85×ΔA÷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。

CPT-1（nmol/min/10^4 cell）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷（500×V 样÷V 样总）÷T=0.0237×ΔA

V 反总：反应体系总体积，9.6×10^{-4} L；ε：TNB 摩尔消光系数，1.36×10^4 L / mol /cm；d：比色皿径，1cm；V 样：加入样本体积，0.04 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，30min；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。