

肉毒碱棕榈酰转移酶 (CPT1)测试盒 (微量法)

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定。

产品货号: BA2370

产品规格: 100管/96样

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/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:

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/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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

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 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 880 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 177.8 \times \Delta A \div W$$

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 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.3556 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 2.4×10^{-4} L; ϵ : TNB摩尔消光系数, 1.36×10^4 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm;

V样: 加入样本体积, 0.01mL; V样总: 加入提取液体积, 0.202mL; 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 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1760 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 355.6 \times \Delta A \div W$$

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 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPT-1 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.711 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 2.4×10^{-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样: 加入样本体积, 0.01mL; V样总: 加入提取液体积, 0.202mL; 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com