

游离肉碱、总肉碱含量检测试剂盒（微量法）

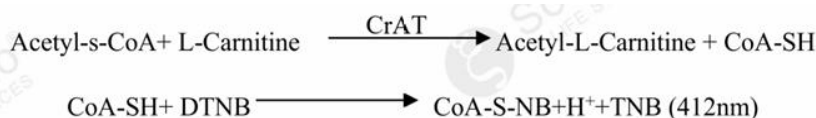
产品货号：BA3492

产品规格：100T/96S

产品简介：

肉碱(Carnitine)也称肉毒碱，是一类非蛋白氨基酸。在生物体内，肉碱与脂肪酸代谢有关，主要作为载体将长链脂肪酸从线粒体膜外运送到线粒体膜内，从而促进脂肪酸 β -氧化。此外，肉碱还在线粒体内酰基CoA/CoA比率的调节、生物体内自由基的消除等生理功能中起着重要作用。本试剂盒测定的总肉碱是游离肉碱和酸溶的短链酯酰基肉碱的总和。

在肉碱乙酰转移酶的催化作用下，乙酰辅酶A的乙酰基转移至肉碱，生成游离态辅酶A。游离态辅酶A可与DTNB反应生成TNB，在412nm处有特征吸收峰，通过测定吸光值的变化，计算游离肉碱和总肉碱含量。



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。

产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体70mL×2瓶	2-8℃
试剂一	液体5mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体4mL×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃
试剂四	液体30 μ L×1支	2-8℃
标准品	液体1mL×1支	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂三：试剂置于试剂瓶内棕色玻璃瓶中，临用前加入 9mL 蒸馏水充分溶解。未用完的试剂-20℃ 分装保存 4 周，避免反复冻融。
2. 试剂四：该试剂体积量少，临用前离心至底部后使用(掌上离心机甩离)。
3. 试剂四工作液：临用前根据样本量按照试剂四:蒸馏水=1 μ L:49 μ L(共 50 μ L，约 5T)的比例配制工作液后使用，现配现用。
4. 标准品：5mg/mL-肉碱标准品。
5. 0.04mg/mL 标准品配制：临用前取 100 μ L 的 5mg/mL 标准品，加入 900 μ L 蒸馏水充分混合配制成 0.5mg/mL 标准品。再取 80 μ L 0.5mg/mL 标准品和 920 μ L 蒸馏水混合配制成 0.04mg/mL 标准品备用。

所需的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/金属浴/恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、pH试纸、研钵/匀浆器、5mL EP管、2mL EP管、蒸馏水和冰、1mol/L KOH和6mol/L KOH(大于3mol/L即可)、6mol/L HClO₄(大于3mol/L即可，也可更换为盐酸或者硫酸，以HClO₄最佳)。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）：



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

- 组织：称取约 0.25g 样本于 5mL EP 管内，加入 1.25mL 蒸馏水，冰浴匀浆后加入 1.25mL 提取液充分混匀，于 4℃，12000g 离心 10min(若上清液仍浑浊，取上清后再次离心)，取全部上清液(约 2.3mL)。
 - 游离肉碱提取：取步骤 1 里的上清液 1mL 于 2mL EP 管内，用 1mol/L KOH 调 PH 至 6.5±0.5(大约加 100μL 左右)，蒸馏水定容至 1.5mL，4℃ 8000g 离心 5min 后取上清，用于测定游离肉碱含量。
 - 总肉碱提取：取步骤 1 里的上清液 1mL 于 2mL EP 管内，用 6mol/L KOH 调 PH 至 13 左右(大约加 20-30μL)，然后置于 40℃ 水浴 60min，冷却至常温，用 6mol/L HClO₄ 调 PH 至 6.5±0.5(大约加 5-20μL)，蒸馏水定容至 1.5mL，4℃ 8000g 离心 5min 后取上清，用于测定总肉碱含量。
- 液体样本：取 1.25mL 液体于 5mL EP 管内，加入 1.25mL 提取液，充分混匀于 4℃，12000g 离心 10min(若上清液仍浑浊，取上清后再次离心)，取全部上清液(约 2.3mL)。
 - 游离肉碱提取：取步骤 1 里的上清液 1mL 于 2mL EP 管内，用 1mol/L KOH 调 PH 至 6.5±0.5(大约加 100μL 左右)，蒸馏水定容至 1.5mL，4℃ 8000g 离心 5min 后取上清，用于测定游离肉碱含量。
 - 总肉碱提取：取步骤 1 里的上清液 1mL 于 2mL EP 管内，用 6mol/L KOH 调 PH 至 13(大约加 20-30μL)，然后置于 40℃ 水浴 60min，冷却至常温，用 6mol/L HClO₄ 调 PH 至 6.5±0.5(大约加 5-20μL)，蒸馏水定容至 1.5mL，4℃ 8000g 离心 5min 后取上清，用于测定总肉碱含量。

注：由于是用强酸强碱调 pH，所以建议少量多次微调，混匀后 pH 试纸测定 pH。

二、测定步骤

- 可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm，可见分光光度计用蒸馏水调零。
- 临用前将试剂一置于 37℃ 预热 10min 以上，试剂二、三平衡至常温。
- 加样表（在微量玻璃比色皿/96 孔板中按下表步骤加样）：

试剂名称 (μL)	测定管	标准管	空白管
样本	40	-	-
标准品	-	40	-
蒸馏水	-	-	40
试剂一	40	40	40
试剂二	30	30	30
试剂三	80	80	80
加入试剂三后立即充分混匀，迅速置于 37℃ 准确反应 5min，412nm 处测定初始吸光值 A1。游离肉碱吸光值记为 A1，总肉碱吸光值记为 A1。(样本量过多时，可将试剂一、二配成工作液，勿添加试剂三)			
试剂四工作液	10	10	10
加入试剂四后立即充分混匀，迅速置于 37℃ 环境中反应 10min(酶标仪有控温功能可将温度调至 37℃)，拿出迅速擦干测定 10min 时的吸光值 A2，游离肉碱吸光值记为 A2，总肉碱吸光值记为 A2'。ΔA 标准=A2 标准-A1 标准，ΔA 空白=A2 空白-A1 空白，ΔA 游=A2 测定-A1 测定，ΔA 总=A2'测定-A1'测定。空白管和标准管只需测定 1-2 次。			

三、游离肉碱和总肉碱的含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{游离肉碱含量(mg/gprot)} = \frac{C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{游}} - \Delta A_{\text{空白}})}{(\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}})} \times V_{\text{定容}} \div V_{\text{上清}} \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) \times F$$

$$= 0.06 \times (\Delta A_{\text{游}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times F$$

$$\text{总肉碱含量(mg/gprot)} = \frac{C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{总}} - \Delta A_{\text{空白}})}{(\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}})} \times V_{\text{定容}} \div V_{\text{上清}} \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) \times F$$

$$= 0.06 \times (\Delta A_{\text{总}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times F$$

(2) 按样本质量计算



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

$$\text{游离肉碱含量(mg/g质量)} = C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{游}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{定容}} \div V_{\text{上清}} \times V_{\text{提取}} \div W \times F \\ = 0.15 \times (\Delta A_{\text{游}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \times F$$

$$\text{总肉碱含量(mg/g质量)} = C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{总}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{定容}} \div V_{\text{上清}} \times V_{\text{提取}} \div W \times F \\ = 0.15 \times (\Delta A_{\text{总}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \times F$$

(3) 按液体体积计算

$$\text{游离肉碱含量(mg/mL)} = C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{游}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{定容}} \div V_{\text{上清}} \times V_{\text{提取}} \times F \\ = 0.15 \times (\Delta A_{\text{游}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times F$$

$$\text{总肉碱含量(mg/mL)} = C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{总}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{定容}} \div V_{\text{上清}} \times V_{\text{提取}} \times F \\ = 0.15 \times (\Delta A_{\text{总}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times F$$

C标准: L-肉碱标准品浓度, 0.04mg/mL; V定容: 前处理中样本定容后的体积, 1.5mL; V上清: 肉碱提取时所取步骤1中的上清液体积, 1mL; V提取: 前处理中蒸馏水和提取液总体积, 2.5mL; Cpr: 蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; F: 样本稀释倍数。

注意事项:

1. 若样本 $\Delta A > 1$, 可以用蒸馏水稀释样本后测定; 若样本 $\Delta A_{\text{游}} < 0.01$, 可以加大样本量后进行测定(同时减小试剂一体积), 注意同步修改标准管和空白管。
2. 提取液中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白浓度, 需另取组织测定。

实验实例:

1. 称取 0.2500g 大鼠心脏组织进行样本处理, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{标准}} = A2_{\text{标准}} - A1_{\text{标准}} = 0.411 - 0.093 = 0.318$, $\Delta A_{\text{空白}} = A2_{\text{空白}} - A1_{\text{空白}} = 0.098 - 0.095 = 0.003$, $\Delta A_{\text{游}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}} = 0.360 - 0.325 = 0.035$, $\Delta A_{\text{总}} = A2'_{\text{测定}} - A1'_{\text{测定}} = 0.650 - 0.581 = 0.069$ 。按样本质量计算的:
游离肉碱含量(mg/g 质量) = $0.146 \times (\Delta A_{\text{游}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \times F = 0.059 \text{ mg/g 质量}$
总肉碱含量(mg/g 质量) = $0.107 \times (\Delta A_{\text{总}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \times F = 0.090 \text{ mg/g 质量}$
(注: 本次实验总肉碱提取时定容至 1.1mL, 即 V 定容=1.1mL)
2. 称取 0.2500g 全脂奶粉进行样本处理, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{标准}} = A2_{\text{标准}} - A1_{\text{标准}} = 0.411 - 0.093 = 0.318$, $\Delta A_{\text{空白}} = A2_{\text{空白}} - A1_{\text{空白}} = 0.098 - 0.095 = 0.003$, $\Delta A_{\text{游}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}} = 0.156 - 0.115 = 0.041$, $\Delta A_{\text{总}} = A2'_{\text{测定}} - A1'_{\text{测定}} = 0.163 - 0.066 = 0.097$ 。按样本质量计算的:
游离肉碱含量(mg/g 质量) = $0.146 \times (\Delta A_{\text{游}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \times F = 0.070 \text{ mg/g 质量}$
总肉碱含量(mg/g 质量) = $0.107 \times (\Delta A_{\text{总}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \times F = 0.128 \text{ mg/g 质量}$
(注: 本次实验总肉碱提取时定容至 1.1mL, 即 V 定容=1.1mL)



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>