

游离肉碱、总肉碱含量检测试剂盒（可见分光光度法）

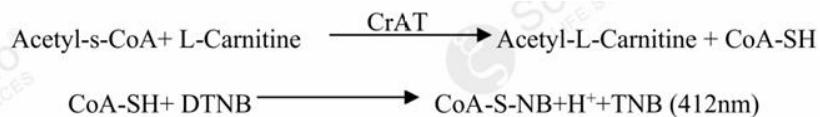
产品货号：BA3491

产品规格：50T/48S

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×1瓶	2-8°C
试剂一	液体15mL×1瓶	2-8°C
试剂二	液体10mL×1瓶	2-8°C
试剂三	粉剂×1瓶	-20°C, 避光
试剂四	液体6μL×1支	2-8°C
标准品	液体1mL×1支	2-8°C

溶液的配制：

- 试剂三：试剂置于试剂瓶内棕色玻璃瓶中，临用前加入 25mL 蒸馏水充分溶解。未用完的试剂-20°C 分装保存 4 周，避免反复冻融。
- 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)。
- 试剂四工作液：临用前根据样本量按照试剂四:蒸馏水=10μL:90μL(共 100μL, 约 10T)的比例配制成立液后使用，现配现用。
- 标准品：5mg/mL L-肉碱标准品。
- 0.04mg/mL 标准品配制：临用前取 100μL 的 5mg/mL 标准品，加入 900μL 蒸馏水充分混合配制成 0.5mg/mL 标准品。再取 80μL 0.5mg/mL 标准品和 920μL 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、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、1mL玻璃比色皿、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

QQ：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

1. 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°C，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)。
 - A. 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°C 8000g 离心 5min 后取上清，用于测定游离肉碱含量。
 - B. 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°C 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°C 8000g 离心 5min 后取上清，用于测定总肉碱含量。
2. 液体样本：取 1.25mL 液体于 5mLEP 管内，加入 1.25mL 提取液，充分混匀于 4°C，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)。
 - A. 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°C 8000g 离心 5min 后取上清，用于测定游离肉碱含量。
 - B. 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°C 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°C 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

1. 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 412nm，用蒸馏水调零。
2. 临用前将试剂一置于 37°C 预热 10min 以上，试剂二、三平衡至常温。
3. 加样表（在 1mL 玻璃比色皿中按下表步骤加样）：

试剂名称 (μL)	测定管	标准管	空白管
样本	200	-	-
标准品	-	200	-
蒸馏水	-	-	200
试剂一	240	240	240
试剂二	150	150	150
试剂三	400	400	400
加入试剂三立即充分混匀，迅速置于 37°C 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°C 环境中反应 10min，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

$$\begin{aligned} \text{游离肉碱含量(mg/gprot)} &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{游}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{定容}} \div V_{\text{上清}} \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) \times F \\ &= 0.06 \times (\Delta A_{\text{游}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{总肉碱含量(mg/gprot)} &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{总}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div V_{\text{上清}} \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) \times F \\ &= 0.06 \times (\Delta A_{\text{总}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

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



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

QQ: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

$$=0.15 \times (\Delta A_{游} - \Delta A_{空白}) \div (\Delta A_{标准} - \Delta A_{空白}) \div W \times F$$

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

$$=0.15 \times (\Delta A_{总} - \Delta A_{空白}) \div (\Delta A_{标准} - \Delta A_{空白}) \div W \times F$$

(3) 按液体体积计算

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

$$=0.15 \times (\Delta A_{游} - \Delta A_{空白}) \div (\Delta A_{标准} - \Delta A_{空白}) \times F$$

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

$$=0.15 \times (\Delta A_{总} - \Delta A_{空白}) \div (\Delta A_{标准} - \Delta A_{空白}) \times F$$

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:

- 若样本 $\Delta A > 0.8$, 可以用蒸馏水稀释样本后测定; 若样本 $\Delta A_{游} < 0.01$, 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。
- 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:

- 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 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{标准} = A_2 - A_1$ 标准 $=0.624 - 0.119 = 0.505$, $\Delta A_{空白} = A_2_{空白} - A_1_{空白} = 0.127 - 0.122 = 0.005$, $\Delta A_{游} = A_2_{测定} - A_1_{测定} = 0.445 - 0.355 = 0.090$, $\Delta A_{总} = A_2'_{测定} - A_1'_{测定} = 0.430 - 0.285 = 0.147$ 。按样本质量计算的:

$$\text{游离肉碱含量(mg/g 质量)} = 0.146 \times (\Delta A_{游} - \Delta A_{空白}) \div (\Delta A_{标准} - \Delta A_{空白}) \div W \times F = 0.099 \text{ mg/g 质量}$$

$$\text{总肉碱含量(mg/g 质量)} = 0.107 \times (\Delta A_{总} - \Delta A_{空白}) \div (\Delta A_{标准} - \Delta A_{空白}) \div W \times F = 0.122 \text{ mg/g 质量}$$

(注: 本次实验总肉碱提取时定容至 1.1mL, 即 V 定容=1.1mL)

- 称取 0.2500g 全脂奶粉进行样本处理, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{标准} = A_2 - A_1$ 标准 $=0.624 - 0.119 = 0.505$, $\Delta A_{空白} = A_2_{空白} - A_1_{空白} = 0.127 - 0.122 = 0.005$, $\Delta A_{游} = A_2_{测定} - A_1_{测定} = 0.206 - 0.123 = 0.083$, $\Delta A_{总} = A_2'_{测定} - A_1'_{测定} = 0.265 - 0.107 = 0.158$ 。按样本质量计算的:

$$\text{游离肉碱含量(mg/g 质量)} = 0.146 \times (\Delta A_{游} - \Delta A_{空白}) \div (\Delta A_{标准} - \Delta A_{空白}) \div W \times F = 0.091 \text{ mg/g 质量}$$

$$\text{总肉碱含量(mg/g 质量)} = 0.107 \times (\Delta A_{总} - \Delta A_{空白}) \div (\Delta A_{标准} - \Delta A_{空白}) \div W \times F = 0.131 \text{ mg/g 质量}$$

(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>