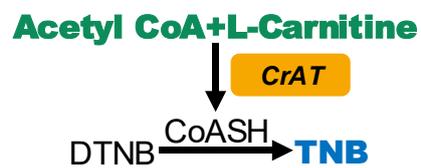




游离肉碱、总肉碱含量检测试剂盒

Free Carnitine、Total Carnitine Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司  
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



## 游离肉碱、总肉碱含量检测试剂盒

### Free Carnitine、Total Carnitine Content Assay Kit

#### 一、产品描述

肉碱 (Carnitine) 属于非蛋白氨基酸, 是体内必需的微量营养素。肉碱作为载体将长链脂肪酸从线粒体膜外运输到膜内, 进行  $\beta$ -氧化产生能量。此外, 肉碱还可以调节线粒体内酰基-CoA/CoA 的比例, 参与自由基的清除, 维持细胞的氧化还原平衡, 总肉碱是游离肉碱和酸溶短链脂酰基肉碱的总和。

酸溶短链脂酰基肉碱经处理后水解为游离肉碱, 肉碱与乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 在肉碱乙酰转移酶 (CrAT) 催化下生成游离态辅酶 A (CoASH), CoASH 与 DTNB 反应生成 TNB, TNB 在 412 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可定量检测游离肉碱与总肉碱的含量。

#### 二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 70 mL×2 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 5 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 4 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C 避光保存	使用前加入 9 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C 可保存 1 个月, 避免反复冻融)
试剂四	液体 30 $\mu$ L×1 支	-20°C 保存	按照试剂四: 蒸馏水=1:49 的体积比配制 (即为试剂四应用液, 现用现配)
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C 保存	5 mg/mL L-肉碱标准液
标准应用液的制备 (现用现配): 使用前将 5 mg/mL 的 L-肉碱标准液使用蒸馏水稀释至 0.04 mg/mL 即为标准应用液。			

自备试剂: ①1 mol/L 氢氧化钾溶液; ②6 mol/L 氢氧化钾溶液; ③6 mol/L 高氯酸溶液

#### 三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱、5 mL 离心管、2 mL 离心管、1 mol/L KOH、6 mol/L KOH、6 mol/L HClO<sub>4</sub> 和蒸馏水。

## 1.待测样本的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：称取 0.3 g 组织至 5 mL 离心管中，加入 1.5 mL 蒸馏水，冰浴匀浆，加入 1.5 mL 提取液充分混匀，4°C 12000 g 离心 10 min，取上清液即为待测样本。

②液体样本：吸取 1.5 mL 液体样本至 5 mL 离心管中，加入 1.5 mL 提取液充分混匀，4°C 12000 g 离心 10 min，取上清液即为待测样本。

## 2.游离肉碱、总肉碱上清液的制备

①游离肉碱上清液：吸取 1 mL 待测样本至 2 mL 离心管中，使用 1 mol/L KOH 调 pH 至 6.5±0.5（约 100 μL 左右），蒸馏水定容至 1.5 mL，4°C 8000 g 离心 5 min，取上清液即游离肉碱上清液。

②总肉碱上清液：吸取 1 mL 待测样本至 2 mL 离心管中，使用 6 mol/L KOH 调 pH 至 13±0.5（约 20-30 μL 左右），40°C 反应 60 min，冷却至室温，使用 6 mol/L HClO<sub>4</sub> 调 pH 至 6.5±0.5，蒸馏水定容至 1.5 mL，4°C 8000 g 离心 5 min，取上清液即总肉碱上清液。

## 2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 412 nm。

②试验前将试剂一置于 37°C 预热 10 min 以上，将试剂二、试剂三置于 25°C 预热 5 min 以上。

③在 96 孔板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 a (μL)	测定组 b (μL)	标准组 (μL)	空白组 (μL)
游离肉碱上清液	40	-	-	-
总肉碱上清液	-	40	-	-
标准应用液	-	-	40	-
蒸馏水	-	-	-	40
试剂一	40	40	40	40
试剂二	30	30	30	30
试剂三	80	80	80	80
①充分混匀，37°C 准确反应 5 min				
②立即测定 412 nm 吸光值，记为 A1				
试剂四应用液	10	10	10	10
①充分混匀，37°C 准确反应 10 min				
②立即测定 412 nm 处吸光值，记为 A2				

计算  $\Delta A$  游离肉碱 = (A2 测定 a - A1 测定 a) -  $\Delta A$  空白， $\Delta A$  总肉碱 = (A2 测定 b - A1 测定 b) -  $\Delta A$  空白， $\Delta A$  标准 = A1 标准 - A2 标准， $\Delta A$  空白 = A1 空白 - A2 空白。注：标准组和空白组只需测定 1-2 次。

### 3.游离肉碱、总肉碱含量计算

#### ①按组织蛋白浓度计算

$$\text{游离肉碱 (mg/mg prot)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{游离肉碱}} \times V_{\text{定容}} \times D}{\Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}} = \frac{0.06 \times \Delta A_{\text{测定}} \times D}{\Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{pr}}}$$

$$\text{总肉碱含量 (mg/mg prot)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{总肉碱}} \times V_{\text{定容}} \times D}{\Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}} = \frac{0.06 \times \Delta A_{\text{测定}} \times D}{\Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{pr}}}$$

#### ②按组织样本质量计算

$$\text{游离肉碱 (mg/g)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{游离肉碱}} \times V_{\text{定容}} \times V_{\text{样总}} \times D}{\Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \times W} = \frac{0.18 \times \Delta A_{\text{测定}} \times D}{\Delta A_{\text{标准}} \times W}$$

$$\text{总肉碱含量 (mg/g)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{总肉碱}} \times V_{\text{定容}} \times V_{\text{样总}} \times D}{\Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \times W} = \frac{0.18 \times \Delta A_{\text{测定}} \times D}{\Delta A_{\text{标准}} \times W}$$

#### ③液体样本体积计算

$$\text{游离肉碱含量 (mg/mL)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{游离肉碱}} \times V_{\text{定容}} \times V_{\text{样总}} \times D}{\Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \times V_{\text{液}}} = \frac{0.12 \times \Delta A_{\text{测定}} \times D}{\Delta A_{\text{标准}}}$$

$$\text{总肉碱含量 (mg/mL)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{总肉碱}} \times V_{\text{定容}} \times V_{\text{样总}} \times D}{\Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \times V_{\text{液}}} = \frac{0.12 \times \Delta A_{\text{测定}} \times D}{\Delta A_{\text{标准}}}$$

**注释：** C 标：L-肉碱标准应用液浓度，0.04 mg/mL；V 定容：游离肉碱/总肉碱提取过程中定容后的体积，1.5 mL；V 样：游离肉碱/总肉碱上清液提取过程中加入待测样本的体积，1 mL；V 样总：待测样本的总体积，3 mL；V 液：提取过程中加入液体样本的体积，1.5 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；D：待测样本/游离肉碱上清液/总肉碱上清液稀释倍数，若未稀释则为 1。

### 四、注意事项

- ①若测定样本较多，可将试剂一、试剂二按比例配成检测工作液（现用现配），25℃预热 5 min，试剂三不可配成检测工作液且在需试剂一、试剂二后再加入；
- ②提取过程中调节 pH 时，适当调整 KOH/HClO<sub>4</sub> 溶液体积或小体积加入，防止调过 pH；
- ③提取液中含有蛋白沉淀组分，上清液不能用于蛋白含量测定；若使用蛋白浓度计算游离肉碱、总肉碱含量，则需另取样本使用 PBS 或生理盐水按相同步骤制备为待测样本，再进行蛋白浓度测定；
- ④若 ΔA 测定大于 1.0 时，建议将待测样本或水解液使用蒸馏水适当稀释后再进行测定；ΔA 测定小于 0.01 时建议制备更高浓度待测样本或水解液后再进行测定，计算时相应修改；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

