

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0325

Size: 100T/96S

脂肪酸合成酶 (FAS) 检测试剂盒说明书

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

一、测定意义:

FAS 是脂肪酸合成关键酶, 催化乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 而生成长链脂肪酸。FAS 普遍表达于各种组织细胞中, 在哺乳动物肝、肾、脑、肺和乳腺以及脂肪组织中表达丰富。

二、测定原理:

FAS 催化乙酰 CoA、丙二酰 CoA 和 NADPH 生成长链脂肪酸和 NADP^+ ; NADPH 在 340nm 有吸收峰, 而 NADP^+ 没有; 通过测定 340nm 光吸收下降速率, 计算 FAS 活性。

三、需自备的仪器和用品:

研钵、冰、台式离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (ZC-1036: UV 板)、可调式移液枪和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1 瓶	-20℃保存	用前 1 d 取出置于 4℃充分解冻后混匀
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 440 μL 试剂四, 充分溶解
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 440 μL 试剂四, 充分溶解
试剂四	液体×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 840 μL 试剂四, 充分溶解

五、操作步骤：

● 粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量 (g)：试剂一体积 (mL) 为 1:5-10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。16000rpm, 4℃离心 40min，取上清置于冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500-1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3 分钟）；然后 16000rpm, 4℃离心 40min，取上清置于冰上待测。

● FAS 测定操作：

1. 分光光度计预热 30min，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂四置于 40℃水浴中预热 30 min 以上。
3. 空白管：在 500 μ LEP 管中依次加入 20 μ L 蒸馏水、4 μ L 试剂二、4 μ L 试剂三、164 μ L 试剂四和 8 μ L

试剂五，迅速混匀后于 340nm 处测定吸光值，记录第 30s 和 90s 时吸光值，分别记录为 A1 和 A2。 $\Delta A_{\text{空}} = A1 - A2$ 。

4. 测定管：在 500 μ LEP 管中依次加入 20 μ L 上清液、4 μ L 试剂二、4 μ L 试剂三、164 μ L 试剂四和 8 μ L 试剂五，迅速混匀后于 340nm 处测定吸光值，记录第 30s 和 90s 时吸光值，分别记录为 A1 和 A2。 $\Delta A_{\text{测}} = A3 - A4$ 。

六、FAS 活性计算：

● 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：37℃中每毫克蛋白每分钟氧化 1 μ mol NADPH 为 1U。

$$\begin{aligned} \text{FAS (U/mg prot)} &= [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反应总}} \times 10^6] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：37°C中每克组织每分钟氧化 1 μmol NADPH 为 1U。

$$\text{FAS (U/g)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \varepsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$
$$= 1.61 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：37°C中每 10^4 个细胞每分钟氧化 1 μmol NADPH 为 1U。

$$\text{FAS (U/} 10^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \varepsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$
$$= 1.61 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

ε : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1 cm; $V \text{ 反总}$: 反应体系总体积, $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; C_{pr} : 上清液蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, $V \text{ 样}$: 加入反应体系中上清液体积, $20 \mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$; T : 反应时间, 1min。

● 使用 96 孔板测定的计算公式如下:

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：37°C中每毫克蛋白每分钟氧化 1 μmol NADPH 为 1U。

$$\text{FAS (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \varepsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \div T$$
$$= 3.22 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div C_{pr}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：37°C中每克组织每分钟氧化 1 μmol NADPH 为 1U。

$$\text{FAS (U/g)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \varepsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$
$$= 3.22 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：37°C 中每 10^4 个细胞每分钟氧化 $1\ \mu\text{mol}$ NADPH 为 1U。

$$\text{FAS (U/10}^4\text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \varepsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 3.22 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

ε : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96 孔板 (UV 板) 光径, $0.5\ \text{cm}$; V 反总: 反应体系总体积, $200\ \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}\ \text{L}$; C_{pr} : 上清液蛋白质浓度, mg/mL ; W : 样本质量, V 样: 加入反应体系中上清液体积, $20\ \mu\text{L} = 0.02\text{mL}$; T : 反应时间, 1min 。

注意事项: 上清液蛋白质浓度需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒 (货号: ZC-S0470)。