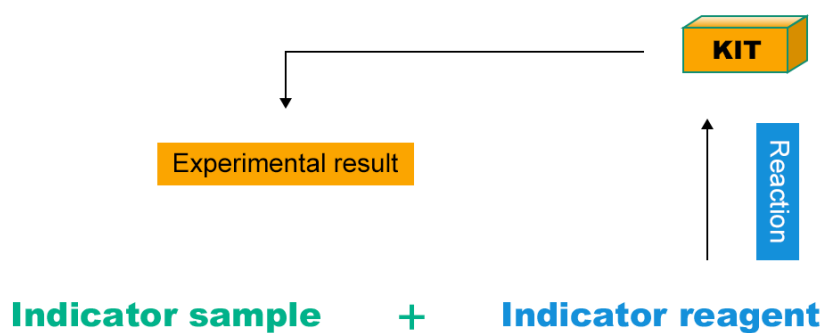


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0595

Size: 10T/9S

脂肪酸合成酶 (FAS) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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、1mL 石英比色皿、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×瓶	-20℃保存	用前取出置于 4℃充分解冻后混匀
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 220 μL 试剂四, 充分溶解
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 220 μL 试剂四, 充分溶解
试剂四	液体 10 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 440 μL 试剂四, 充分溶解

五、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。12000g，4℃离心 40min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10^4 个)：试剂一体积 (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 3min）；然后 12000g，4℃，离心 40min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

六、FAS 测定操作：

1. 分光光度计预热 30min，调节波长到 340nm，蒸馏水调零。
2. 试剂四置于 37℃水浴中预热 30min。
3. 空白管：在 1mL 石英比色皿中依次加入 100 μ L 蒸馏水、20 μ L 试剂二、20 μ L 试剂三、820 μ L 试剂四和 40 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 1mL 石英比色皿中依次加入 100 μ L 上清液、20 μ L 试剂二、20 μ L 试剂三、820 μ L 试剂四和 40 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 A3 和 A4。 $\Delta A_{\text{测}} = A3 - A4$ 。

注意：空白管只需测定一次。

七、FAS 活性计算公式：

(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 1 个酶活单位。

$$\text{FAS} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反应}} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{Cpr}$$

(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 1 个酶活单位。

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

(2) 按细胞数量计算

活性单位定义：37°C中每 10⁴个细胞每分钟氧化 1 μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

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

(3) 按液体体积计算

活性单位定义：37°C中每毫升样本每分钟氧化 1 μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div V \text{ 样} \div T = 1.61 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 /mol/cm; d: 比色皿光径, 1 cm; V 反总: 反应体系总体积, 1000 μL=0.001 L; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 100 μL=0.1 mL; T: 反应时间, 1min。

八、注意事项:

1. 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)
2. 配制好的试剂 4°C保存, 三天内使用完毕。