

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

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

产品内容：

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

产品简介：

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。

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。

试验中所需的仪器和试剂：

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（UV板）、可调式移液枪和蒸馏水。

操作步骤：

一、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（10⁴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。

二、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°C水浴中预热30 min以上。
3. 空白管：在500 μL EP管中依次加入20 μL蒸馏水、4 μL试剂二、4 μL试剂三、164 μL试剂四和8 μL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。
 $\Delta A_{空} = A1 - A2$ 。
4. 测定管：在500 μL EP管中依次加入20 μL上清液、4 μL试剂二、4 μL试剂三、164 μL试剂四和8 μL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。
 $\Delta A_{测} = A3 - A4$ 。

三、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°C中每毫克蛋白每分钟氧化1 μmol NADPH 为1U。

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

$$= 1.61 \times (\Delta A_{测定管} - \Delta A_{空白管}) \div C_{pr}$$

(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。

$$FAS(U/g) = [(\Delta A_{测定管} - \Delta A_{空白管}) \div \epsilon \div d \times V_{反总} \times 10^6] \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div T$$

$$= 1.61 \times (\Delta A_{测定管} - \Delta A_{空白管}) \div W$$

(3) 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1U。

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

$$= 1.61 \times (\Delta A_{测定管} - \Delta A_{空白管}) \div \text{细胞数量}$$

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; $V_{反总}$: 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。

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。

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

$$= 3.22 \times (\Delta A_{测定管} - \Delta A_{空白管}) \div C_{pr}$$

(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。

$$FAS(U/g) = [(\Delta A_{测定管} - \Delta A_{空白管}) \div \epsilon \div d \times V_{反总} \times 10^6] \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div T$$

$$= 3.22 \times (\Delta A_{测定管} - \Delta A_{空白管}) \div W$$

(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 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 。

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。