

脂肪酸合成酶(FAS)活性检测试剂盒

Fatty Acid Synthase Assay Kit

微量法

货号：AK241

规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK241-A	100ml×1 瓶	-20℃保存；用前 1 d 取出置于 4℃充分解冻后混匀。
AK241-B	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 440μL AK241-D，充分溶解。
AK241-C	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 440μL AK241-D，充分溶解。
AK241-D	50ml×1 瓶	4℃保存；
AK241-E	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 840μL AK241-D，充分溶解。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：脂肪酸合成酶 (Fatty Acid Synthase, 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。

原理：脂肪酸合成酶催化乙酰 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。

自备用品：

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、可调式移液枪和蒸馏水。

粗酶提取：

- 组织：按照组织质量 (g): AK241-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL AK241-A）进行冰浴匀浆。16000rpm, 4℃离心 40min, 取上清置冰上待测。
- 细菌、真菌：按照细胞数量 (10⁴ 个): AK241-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL AK241-A），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 16000rpm, 4℃，离心 40min，取上清置于冰上待测。
- 血清等液体：直接测定。

测定步骤：

- 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
- AK241-D 置于 40℃水浴中预热 30 min。
- 在 1mL 石英比色皿中依次加入下列试剂

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)
蒸馏水	20	
AK241-B	4	
AK241-C	4	
AK241-D	164	
AK241-E	8	
迅速混匀后 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。△A 空=A1-A2。		
上清液		20

AK241-B		4
AK241-C		4
AK241-D		164
AK241-E		8

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。△A 测=A3-A4。

注意：空白管只需测定 1-2 次

FAS 活性计算公式：

a. 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 μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FAS (U/mg prot)} &= [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 1.61 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div Cpr \end{aligned}$$

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

2. 按照样本质量计算

活性单位定义：37℃中每克组织每分钟氧化 1 μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

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

3. 按细胞数量计算

活性单位定义：37℃中每 10^4 个细胞每分钟氧化 1 μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

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

4. 按液体体积计算

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

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

注： 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， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量；V 样：加入反应体系中上清液体积， $20 \mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$ ；V 样总：提取液体积，1 mL；T：反应时间，1 min。

b. 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℃中每毫克蛋白每分钟氧化 1 μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FAS (U/mg prot)} &= [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 3.22 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div Cpr \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

活性单位定义：37℃中每克组织每分钟氧化 1 μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

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

3. 按细胞数量计算

活性单位定义：37℃中每 10^4 个细胞每分钟氧化 1 μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

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

4. 按液体体积计算

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

$$FAS (\text{U/mL}) = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div V_{\text{样}} \div T = 3.22 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}})$$

ε : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$; d : 96 孔板光径, 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 : 样品质量; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $20\mu\text{L}=0.02 \text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 1min。

注意事项:

- 配制好的试剂 4℃保存, 三天内使用完毕。