

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:

1. 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。
2. 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。
3. 血清等液体: 直接测定。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。
2. AK241-D 置于 40℃水浴中预热 30 min。
3. 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。 ΔA 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。

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

$$= 1.61 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

※ 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。

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

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

3. 按细胞数量计算

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

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

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

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。

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

$$= 1.61 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

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 反应：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，1min。

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。

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

$$= 3.22 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

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

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

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

3. 按细胞数量计算

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

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

$$3.22 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

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。

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

ε：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；V 反总：反应体系总体积，200 μL=2×10⁻⁴L；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 μL=0.02 mL；V 样总：提取液体积，1 mL；T：反应时间，1min。

注意事项：

1. 配制好的试剂 4℃保存，三天内使用完毕。