

脂肪酸合成酶 (FAS) 活性试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

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。

自备仪器和用品：

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、可调式移液枪和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，-20℃ 保存。用前 1d 取出置于 4℃ 充分解冻后混匀。

试剂二：粉剂×1 瓶。临用前加入 440μL 试剂四，充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 440μL 试剂四，充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂四：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 840μL 试剂四，充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

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 (10⁴ 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。

FAS 测定操作：

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. 试剂四置于 40℃ 水浴中预热 30 min。
3. 在 96 孔板或 EP 管中依次加入 20μL 上清液、4μL 试剂二、4μL 试剂三、164μL 试剂四和 8μL 试剂五，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=A1-A2。

FAS 活性计算：

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 1nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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 1nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 1608 \times \Delta A \div W$$

(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 1nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 1608 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(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 1nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div V_{\text{样}} \div T \\ = 1608 \times \Delta A$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1 cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 200 μ L=2×10⁻⁴L; 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 μ L=0.02 mL; $V_{\text{样总}}$: 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 1nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 3216 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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 1nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 3216 \times \Delta A \div W$$

(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 1nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 3216 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(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 1nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div V_{\text{样}} \div T \\ = 3216 \times \Delta A$$

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