

脂肪酸合成酶（FAS）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0555

规格：100T/96S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

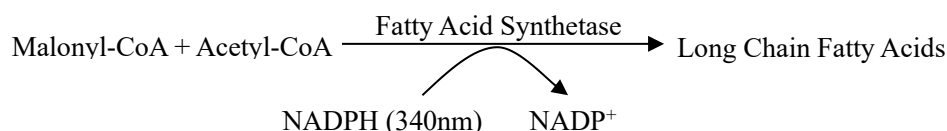
试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂二	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×2 支	-20℃保存

溶液的配制：

1. 试剂一：临用前取一支加入 1 mL 试剂三，充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存 2 周，禁止反复冻融。
2. 试剂二：临用前取一支加入 1 mL 试剂三，充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存 2 周，禁止反复冻融。
3. 试剂四：临用前取一支加入 0.5 mL 试剂三，充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存 2 周，禁止反复冻融。

产品说明：

脂肪酸合成酶（Fatty acid synthetase, FAS）是一种关于脂肪酸再生能力并起重要作用的限速酶，它通过催化丙二酰辅酶 A、乙酰辅酶 A 和 NADPH 生成长链脂肪酸和 NADP⁺，NADPH 在 340nm 条件下有特征吸收峰。通过检测 340nm 条件下吸光值的下降速率，可以计算出 FAS 活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、低温离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器/超声波细胞破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、细菌、细胞样本的制备：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 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300W，超声 3 秒，间隔 9 秒，总时间 5 min）；于 4℃，12000 g 离心 20 min，取上清液，置于冰上待测。

2、组织样本的制备：按照质量（g）：提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1mL

提取液）加入提取液，冰浴匀浆后于 4℃，12000 g 离心 20 min，取上清液，置于冰上待测。

3、血清（浆）等液体样本：直接测定

二、测定步骤

1、紫外分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。

2、试剂三临用前置于 37℃保温 15min。

3、加样表（在 96 孔 UV 板或者微量石英比色皿中加入下列试剂）

试剂名称	测定管	空白管
上清液	20	-
蒸馏水	-	20
试剂一	16	16
试剂二	16	16
试剂三	140	140
试剂四	8	8

迅速吹打混匀，记录第 15s 的吸光值 A1 测定（A1 空白），和 1min15s 时的吸光值 A2 测定（A2 空白），计算 $\Delta A = (A1 \text{ 测定} - A2 \text{ 测定}) - (A1 \text{ 空白} - A2 \text{ 空白})$ 。

空白管只需测定 1-2 次，如果样本数量过多也可以将试剂一到试剂四按上述比例混匀配制成工作液进行测定。

三、FAS 活性计算

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

(1) 按照蛋白浓度计算

单位定义：在 37℃条件下，每毫克蛋白每分钟氧化 1 nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$FAS (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T = 1607.7 \times \Delta A \div Cpr$$

(2) 按照样本质量计算

单位定义：在 37℃条件下，每克组织每分钟氧化 1 nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$FAS (U/g \text{ 质量}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1607.7 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细胞数量计算

单位定义：在 37℃条件下，每 10^4 个细胞每分钟氧化 1 nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$FAS (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (N \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1607.7 \times \Delta A \div N$$

(4) 按液体体积计算

单位定义：在 37℃条件下，每毫升样本每分钟氧化 1 nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$FAS (U/mL) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 1607.7 \times \Delta A$$

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; $V \text{ 反总}$: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$; Cpr : 上清液蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; $V \text{ 样}$: 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, 1 min; N : 细胞数量, 万个 (以万计); 10^9 : 换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

b. 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

(1) 按照蛋白浓度计算

单位定义：在 37℃条件下，每毫克蛋白每分钟氧化 1 nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 2679.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

单位定义：在 37°C 条件下，每克组织每分钟氧化 1 nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS (U/g 质量)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 2679.5 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细胞数量计算

单位定义：在 37°C 条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟氧化 1 nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (N \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 2679.5 \times \Delta A \div N$$

(4) 按液体体积计算

单位定义：在 37°C 条件下，每毫升样本每分钟氧化 1 nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS (U/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 2679.5 \times \Delta A$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10³ L/mol/cm; d: 96 孔板, 0.6 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, g; 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, 1 min; N: 细胞数量, 万个 (以万计); 10⁹: 换算系数, 1mol=10⁹nmol。

注意事项:

- 1、提取液中含有 BSA (约 2mg/mL)，测定上清液蛋白浓度时需要减去提取液中蛋白浓度。
- 2、如果测定吸光值 > 1.5 或 $\Delta A > 0.5$ ，建议用蒸馏水稀释样本后再进行测定，计算公式中乘稀释倍数。如果测定吸光值较小，建议加大样本量后再进行测定。

实验实例:

- 1、取 0.1 g 小鼠肝脏加入 1 mL 提取液进行冰浴匀浆。12000 g 4°C 离心 20 min，取上清置冰上，之后用石英微量比色皿按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = (A1 \text{ 测定} - A2 \text{ 测定}) - (A1 \text{ 空白} - A2 \text{ 空白}) = (1.1783 - 1.0945) - (0.5653 - 0.5593) = 0.0778$ ，按样本质量计算酶活得：
 $\text{FAS (U/g 质量)} = 1607.7 \times \Delta A \div W = 1251 \text{ U/g 质量}$ 。

参考文献:

- [1] Robinson J D, Bradley R M, Brady R O. Biosynthesis of Fatty Acids[J]. Journal of Biological Chemistry, 1960, 238(2).
- [2] Tcl B. Purification and crystallization of rat liver fatty acid synthetase[J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 1981, 209(2):613-619.

相关系列产品:

- BC2340/BC2345 脂肪酶 (LPS) 活性检测试剂盒
- BC1080/BC1085 乙醇脱氢酶 (ADH) 活性检测试剂盒
- BC0590/BC0595 游离脂肪酸 (FFA) 含量检测试剂盒