

脂肪酸合成酶(FAS)试剂盒说明书

(货号: ADS-F-FM024-09 分光法 9 样)

有效期: 3 个月

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、1mL 石英比色皿、可调式移液枪和蒸馏水。

试剂组成和配制:

试剂一: 液体 10ml×1 瓶, -20℃ 保存。用前取出置于 4℃ 充分解冻后混匀。

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存。临用前加入 220 μL 试剂四, 充分溶解。

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4℃ 避光保存。临用前加入 220 μL 试剂四, 充分溶解。

试剂四: 液体 10 mL×1 瓶, -20℃ 保存。

试剂五: 粉剂×1 瓶, 4℃ 避光保存。临用前加入 440 μL 试剂四, 充分溶解。

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、细胞: 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. 液体: 直接测定。

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 37℃ 水浴中预热 30 min 以上。

3. 测定管: 在 1mL 石英比色皿中依次加入 100μL 上清液、20μL 试剂二、20μL 试剂三、820μL 试剂四和 40μL 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。ΔA 测=A1-A2。

FAS 活性计算:

(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。

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

(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 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。

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

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, $1000 \mu\text{L} = 0.001 \text{ L}$; 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, $100 \mu\text{L} = 0.1 \text{ mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 1min。