

脂肪酸合成酶 (Fatty acid synthetase, FAS) 试剂盒说明书

(货号:ADS-F-FM024-25 紫外法 24 样)

一、产品简介:

脂肪酸合成酶 (FAS, EC 2.3.1.85) 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。

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, 通过测定 340nm 光吸收下降速率, 进而计算 FAS 活性大小。

二、测试盒组成和配制:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|-------------|---------|---|
| 提取液 | 液体 30mL×1 瓶 | 4°C保存 | 用前摇匀再用。 |
| 试剂一 | 粉剂 1 支 | -20°C保存 | 用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。 |
| 试剂二 | 粉剂 2 支 | -20°C保存 | 用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 分别加 0.3mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, 一周内用完。 |
| 试剂三 | 液体 18mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂四 | 粉剂 1 支 | 4°C保存 | 用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。 |

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰。

四、脂肪酸合成酶 (FAS) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织 (水分充足的果实样本可取 0.2-0.3g), 加入 1mL 提取液 (用前摇匀再用), 进行冰浴匀浆, 13000rpm, 4°C离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4°C离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 澄清的液体样本直接检测, 若浑浊离心后取上清测定。

2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 |
|--|-----|
| 样本 | 60 |
| 试剂一 | 20 |
| 试剂二 | 20 |
| 试剂三 | 580 |
| 混匀, 室温 (25°C) 孵育反应 10min。 | |
| 试剂四 | 20 |
| 混匀, 室温 (25°C) 于 340nm 处立即读取 A1, 15min 后读取 A2。ΔA=A1-A2。 | |

- 【注】1. 若ΔA 值低于 0.008, 可增加样本加样体积 V1 (如增至 100μL, 则试剂三相应减少, 单需控制 A1 值低于 2) 或延长孵育时间 (如延长至 30min) 再读取 A2 值。
2. 若 A1 值超过 2, 需减少样本加样体积 V1 (如减至 40μL, 则试剂三相应增加), 且ΔA 应小于 0.3。
3. 若下降趋势不稳定, 可以每隔 20S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$FAS(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 125 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$FAS(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 125 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞数量计算:

单位定义: 每 10⁴ 个细胞在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$FAS(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.25 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算:

$$FAS(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 125 \times \Delta A \div W$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.06mL;

V2---反应体系总体积, 7×10⁻⁴ L;

d---光径, 1cm;

ε---NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10³ L / mol/cm;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 15min;

500---细胞数量, 万;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。