

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

(货号:ADS-W-FM024-48 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 用前摇匀再用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂一	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 0.6mL 蒸馏水溶解备用; 3. 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
试剂二	粉剂 2 支	-20℃避光保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 分别加 0.3mL 蒸馏水溶解备用; 3. 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 一周内用完。
试剂三	液体 7mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 0.6mL 蒸馏水溶解备用; 3. 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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、样本提取:

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℃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℃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（ 10^4 ）：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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，所有试剂解冻至室温（25℃）。

② 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（ μL ）	测定管
样本	40
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	130
混匀，室温（25℃）孵育反应 10min。	
试剂四	10
混匀，室温（25℃）于 340nm 处立即读取 A1，15min 后读取 A2。 $\Delta A=A1-A2$ 。	

【注】1. 若 ΔA 值低于 0.008，可增加样本加样体积 V1（如增至 60 μL ，则试剂三相应减少，但需控制 A1 值低于 1.8）或延长孵育时间（如延长至 30min）再读取 A2 值。

2. 若 A1 值超过 1.8，需减少样本加样体积 V1（如减至 20 μL ，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。

$$\text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 107.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 107.2 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞数量计算：

单位定义：每 10^4 个细胞在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.214 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算：

单位定义：每毫升液体样本在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 107.2 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

V2---反应体系总体积，2 $\times 10^4$ L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ 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。