

## 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<sup>+</sup>；NADPH在340nm有吸收峰，而NADP<sup>+</sup>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（10<sup>4</sup>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。

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

$$=1608 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：37°C中每克组织每分钟氧化1nmol NADPH 为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：37°C中每104个细胞每分钟氧化1nmol NADPH 为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/104\text{cell}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：37°C中每毫升样本每分钟氧化1nmol NADPH 为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \end{aligned}$$

$\epsilon$ : NADPH摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{L}/\text{mol}/\text{cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径, 1 cm;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{L}$ ;  $\text{Cpr}$ : 上清液蛋白质浓度,  $\text{mg}/\text{mL}$ ;  $W$ : 样品质量;  $V_{\text{样}}$ : 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, 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°C中每毫克蛋白每分钟氧化1nmol NADPH 为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 3216 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：37°C中每克组织每分钟氧化1nmol NADPH 为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3216 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：37°C中每104个细胞每分钟氧化1nmol NADPH 为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/104\text{cell}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3216 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：37°C中每毫升样本每分钟氧化1nmol NADPH 为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FAS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 3216 \times \Delta A \end{aligned}$$

$\epsilon$ : NADPH摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{L}/\text{mol}/\text{cm}$ ;  $d$ : 96孔板光径, 0.5 cm;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{L}$ ;  $\text{Cpr}$ : 上清液蛋白质浓

度, mg/mL; W : 样品质量; V样: 加入反应体系中上清液体积, 20 $\mu$ L=0.02 mL; V样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 1min。

---

[www.affandi-e.com](http://www.affandi-e.com)