

使用说明书

Instruction Manual

脂肪酸合成酶(FAS)活性检测试剂盒（微量法）

Fatty Acid Synthase Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

脂肪酸合成酶 (Fatty Acid Synthase, 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。

检测原理

脂肪酸合成酶催化乙酰 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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0071M-A	100mL×1 瓶	-20℃保存；用前 1 天取出置于 4℃充分解冻后混匀。
CB0071M-B	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 440μL CB0071M-D，充分溶解。
CB0071M-C	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 440μL CB0071M-D，充分溶解。
CB0071M-D	50mL×1 瓶	4℃保存。
CB0071M-E	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 840μL CB0071M-D，充分溶解。

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品：

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。

二、粗酶提取：

- 组织：按照组织质量 (g)：CB0071M-A 体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0071M-A）进行冰浴匀浆。16000rpm，4℃离心 40min，取上清置冰上待测。
- 细菌、真菌：按照细胞数量 (10⁴ 个)：CB0071M-A 体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL CB0071M-A），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 16000rpm，4℃，离心 40min，取上清置于冰上待测。
- 血清等液体：直接测定。

三、测定步骤：

- 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
- CB0071M-D 置于 40℃水浴中预热 30 min。
- 在 1mL 石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)
蒸馏水	20	
CB0071M-B	4	
CB0071M-C	4	
CB0071M-D	164	
CB0071M-E	8	
迅速混匀后 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。△A 空=A1-A2。		
上清液		20
CB0071M-B		4
CB0071M-C		4
CB0071M-D		164
CB0071M-E		8
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。△A 测=A3-A4。		

注: 空白管只需要测定 1 次。

四、FAS 活性计算公式:

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°C 中每毫克蛋白每分钟氧化 1 μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 1.61 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

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 1 μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 1.61 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

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 1 μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 1.61 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

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 1 μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div V \text{ 样} \div T$$

$$= 1.61 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

注: ε: NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10³ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1 cm; V 反总: 反应体系总体积, 200μL=2×10⁻⁴ L; 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, 20μL=0.02 mL; V 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 1 μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 3.22 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

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 1 μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 3.22 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

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 1μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS } (\mu\text{mol} / \text{min} / 10^4 \text{cell}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 106] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 3.22 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

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 1μmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{FAS } (\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mL}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 106] \div V \text{ 样} \div T$$

$$= 3.22 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

注： ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10³ L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5 cm; V 反总: 反应体系总体积, 200μL=2×10⁻⁴ L; 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, 20μL=0.02 mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 1min。

■ 注意事项

1. 配制好的试剂 4℃保存，三天内使用完。
2. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
3. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

