

游离脂肪酸(NEFA)(酶法)含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-ZF001-48 微板法 48 样)

一、产品简介:

游离脂肪酸又称非酯化脂肪酸(Nonesterified fatty acid NEFA)。其是由油酸, 软脂酸, 亚油酸等组成。血清中游离脂肪酸的浓度与脂类代谢、糖代谢、内分泌功能有关。也可反映食物贮藏中的品质变化。

游离脂肪酸和辅酶A在乙酰辅酶A合成酶(ACS)的作用下反应生成乙酰辅酶A, 乙酰辅酶A在乙酰辅酶A氧化酶的作用下生成H₂O₂, 随后通过Trinder底物在过氧化物酶(POD)的作用下生成有色产物。通过测定该有色产物在546nm处的值即可得出样本中游离脂肪酸的含量。

二、试剂盒组分与配制:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|--------------|-------|--------|
| 试剂一 | 液体 10mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂二 | 液体 2.5mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 标准管 | 液体 0.2mL×1 支 | 4°C保存 | 浓度见标签。 |

三、所需仪器和用品:

酶标仪、96孔板、可调式移液器、离心机、蒸馏水。

四、游离脂肪酸(NEFA)含量检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 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 组织样本, 加 1mL 生理盐水研磨, 粗提液全部转移到 EP 管中, 8000rpm, 常温离心 10min, 上清液待测。

【注】: 若组织样本为高脂样本或部分为高脂样本, 需用无水乙醇进行提取。

② 液体样品: 澄清的液体可直接检测; 若浑浊则离心后取上清液检测。

③ 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 生理盐水研磨, 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); 8000rpm 常温离心 10min, 取上清待测。

【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。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min, 设置温度在 37°C, 设定波长到 546nm。

② 所有试剂解冻至室温, 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 空白管 (仅做一次) | 标准管 (仅做一次) |
|---------------------------------------|-----|---------------|---------------|
| 样本 | 4 | | |
| 蒸馏水 | | 4 | |
| 标准品 | | | 4 |
| 试剂一 | 200 | 200 | 200 |
| 混匀, 37°C 孵育 5min, 于 546nm 处读取吸光值 A1。 | | | |
| 试剂二 | 50 | 50 | 50 |
| 混匀, 37°C 孵育 10min 后于 546nm 处读取吸光值 A2, | | | |

$$\Delta A = A_2 - A_1。$$

- 【注】：1. 若 ΔA 值大于 0.5，须用生理盐水或蒸馏水对样本进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。
2. 若 ΔA 的值小于 0.005，可增加样本加样体积 V1（如由 4 μ L 增至 10 μ L，空白管也由 4 μ L 增至 10 μ L 蒸馏水，标准管也由 4 μ L 增至 10 μ L；其他试剂均保持不变），则改变后的 V1 和 V2 代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{游离脂肪酸(NEFA)}(\mu\text{mol/g}) &= (\text{C 标准} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= \text{C 标准} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{游离脂肪酸(NEFA)}(\text{mmol/L}) &= (\text{C 标准} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div V_1 \times D \\ &= \text{C 标准} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \times D \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{游离脂肪酸}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times V_2) \times 10^3 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= \text{C 标准} \times 2 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度，见标签； V1---加入样本体积，0.004mL；
V2---加入标准品体积，0.004mL； V---提取液体积，1mL；
W---质量，g； 500---细胞数量，万；
D---稀释倍数，未稀释即为 1。