

## 游离脂肪酸(NEFA)(酶法)含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-ZF001-96 微板法 96 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 $H_2O_2$ , 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 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 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( $10^4$ ): 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 ( $\mu$ L)	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 $\Delta A$  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 $\Delta A$  的值小于 0.005，可增加样本加样体积 V1（如由 4 $\mu$ L 增至 10 $\mu$ L，空白管也由 4 $\mu$ L 增至 10 $\mu$ L 蒸馏水，标准管也由 4 $\mu$ L 增至 10 $\mu$ 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：

$$\begin{aligned} \text{游离脂肪酸(NEFA)}(\mu\text{mol/g}) &= (\text{C 标准} \times \text{V}_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (\text{V}_1 \div \text{V} \times \text{W}) \times \text{D} \\ &= \text{C 标准} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div \text{W} \times \text{D} \end{aligned}$$

### 2、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{游离脂肪酸(NEFA)}(\text{mmol/L}) &= (\text{C 标准} \times \text{V}_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div \text{V}_1 \times \text{D} \\ &= \text{C 标准} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \times \text{D} \end{aligned}$$

### 3、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{游离脂肪酸}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V}_2) \times 10^3 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (500 \times \text{V}_1 \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= \text{C 标准} \times 2 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times \text{D} \end{aligned}$$

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。