

游离脂肪酸(NEFA)(酶法)含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-ZF001-24 分光法 24 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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、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 分光光度计预热 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 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm) 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	20		
蒸馏水	200	220	200
标准品			20
试剂一	400	400	400
混匀, 37°C 孵育 5min, 于 546nm 处读取吸光值 A1。			
试剂二	100	100	100
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 0.8，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 值小于 0.005，可增加样本加样体积 V1（如由 20 μ L 增至 40 μ L，空白管也由 220 μ L 增至 240 μ L 蒸馏水，标准管是 20 μ L 标准品和 220 μ L 的蒸馏水；其他试剂均保持不变），则改变后的 V1 代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照质量计算：

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

2、按照体积计算：

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

3、按细胞数量计算：

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

C 标准---标品浓度，见标签； V1---加入样本体积，0.02mL；
V2---加入标准品体积，0.02mL； 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。