

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 有效期：3 个月)

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 2.5mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准管	液体 0.2mL×1 支	4℃避光保存	1. 浓度见标签； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标检测：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以免造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min，设置温度在 37℃，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：

试剂组分 (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℃孵育 5min，于 546nm 处读取吸光值 A1。			
试剂二	50	50	50
混匀，37℃孵育 10min 后于 546nm 处读取吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。			

【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：

$$\begin{aligned}\text{游离脂肪酸(NEFA)}(\mu\text{mol/g}) &= (C_{\text{标准}} \times V2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div W \times D\end{aligned}$$

2、按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned}\text{游离脂肪酸(NEFA)}(\mu\text{mol/mg prot}) &= (C_{\text{标准}} \times V2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (V1 \div V \times Cpr) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div Cpr \times D\end{aligned}$$

3、按照体积计算：

$$\begin{aligned}\text{游离脂肪酸(NEFA)}(\text{mmol/L}) &= (C_{\text{标准}} \times V2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div V1 \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \times D\end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned}\text{游离脂肪酸(nmol/10}^4\text{ cell)} &= (C_{\text{标准}} \times V2) \times 10^3 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times 2 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \times D\end{aligned}$$

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。

Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒