

## 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 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，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 20mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂二	液体 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、指标测定：

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，以防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<sup>4</sup>)：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°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, $\Delta A = A2 - A1$ 。			

【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：

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

### 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：

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

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。

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