

## 游离脂肪酸(FFA)(酶法)含量测定试剂盒说明书

(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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 2.5mL×1 瓶	4℃保存	
标准管	液体 0.2mL×1 支	4℃保存	浓度为1mmol/L。

### 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。

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、上机检测:

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 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℃孵育 5min，于 546nm 处读取吸光值 A1。			

试剂二	100	100	100
混匀，37℃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 0.8，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 $\Delta A$  值小于 0.005，可增加样本加样体积 V1（如由 20 $\mu$ L 增至 40 $\mu$ L，空白管也由 220 $\mu$ L 增至 240 $\mu$ L 蒸馏水，标准管是 20 $\mu$ L 标准品和 220 $\mu$ 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：

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

### 2、按照体积计算：

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

### 3、按细胞数量计算：

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

C 标准---标品浓度，1mmol/L=1 $\mu$ mol/mL；

V2---加入标准品体积，0.02mL；

W---质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

V1---加入样本体积，0.02mL；

V---提取液体积，1mL；

500---细胞数量，万；