

游离脂肪酸(FFA)(酶法)含量测定试剂盒说明书

(微板法 48 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℃ 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:

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。

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 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：

试剂名称 (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 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 μL 增至 10 μL , 空白管也由 4 μL 增至 10 μL 蒸馏水, 标准管也由 4 μL 增至 10 μL ; 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:

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

2、按照体积计算:

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

3、按细胞数量计算:

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

C 标准---标品浓度, 1mmol/L=1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$;

V2---加入标准品体积, 0.004mL;

W---质量, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。

V1---加入样本体积, 0.004mL;

V---提取液体积, 1mL;

500---细胞数量, 万;