

游离脂肪酸(NEFA)(酶法)含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10016F 分光法 24 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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

① 打开分光光度计, 设置温度在 37℃ (等待仪器过自检程序亦可), 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:

试剂组分 (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 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：

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

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：

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

C 标准---标品浓度，见标签；

V1---加入样本体积，0.02mL；

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。

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