

游离脂肪酸(NEFA)(酶法)含量测定试剂盒

分光法 24 样

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。

试剂盒组成和配制:

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	
标准品	液体 0.2mL×1 支	4℃保存	浓度为 1mmol/L。

所需的仪器和用品:

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。

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 (10^4)：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°C，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°C 孵育 5min，于 546nm 处读取吸光值 A_1 。			
试剂二	100	100	100
混匀，37°C 孵育 10min 后于 546nm 处读取吸光值 A_2 ， $\Delta A = A_2 - A_1$ 。			

[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。

结果计算:

1、按照质量计算:

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

2、按照体积计算:

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

3、按细胞数量计算:

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

C 标准---标品浓度, 1mmol/L=1 μ mol/mL; 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。