

游离脂肪酸含量(FFA)(酶法)试剂盒

微板法 48 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:

酶标仪、96 孔板、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 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，			

$$\Delta A = A_2 - A_1。$$

【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 μ L 增至 10 μ L, 空白管也由 10 μ L 增至 14 μ L 蒸馏水, 标准管也由 4 μ L 增至 10 μ L; 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:

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

2、按照体积计算:

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

3、按细胞数量计算:

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

C 标准---标品浓度, 1mmol/L=1 μ mol/mL; 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。