（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K013-M

产品规格：48T(16 samples)/96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪（690-730 nm）

Elabscience®游离脂肪酸(NEFA/FFA)比色法测试盒

Non-esterified Free Fatty Acids (NEFA/FFA) Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织中的游离脂肪酸含量。

检测原理

在弱酸性条件下，游离脂肪酸与铜盐反应生成铜皂，在 715 nm 处有特征吸收峰，在一定范围内游离脂肪酸含量与显色程度呈线性关系，可计算出游离脂肪酸的含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	抽提液 (Extracting Solution)	60 mL×1 瓶	60 mL×2 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	10 mmol/L 标准品溶液 (10 mmol/L Palmitic Acid Standard)	1 mL×1 支	1 mL×2 支	2-8°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	对照液 (Control Solution)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	反应液 (Reaction Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪（690-730 nm，最佳波长 715 nm）、涡旋混匀仪、微量移液器（1000 μL，200 μL，100 μL）

耗材：枪头（1000 μL，200 μL ）、EP 管（1.5 mL、2 mL）

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	**0**	**0.3**	**0.4**	**0.6**	**0.9**	**1.0**	**1.2**	**1.5**
10 mmol/L 标准品 (μL)	0	45	60	90	135	150	180	225
试剂一(μL)	1500	1455	1440	1410	1365	1350	1320	1275

样本准备

① 样本处理

样本要求：必须采用新鲜样本，检测必须在24 h内完成

组织样本：取 0.1-1.0 g 新鲜组织块，用 2-8℃的 PBS（0.01 M，pH 7.4）漂洗，去除血液，滤纸吸干，称重，放入匀浆容器中，按照重量（g）：体积（mL）=1: 12 的比例加入试剂一，进行匀浆，于 4℃，低温振荡器中震荡抽提 2 h，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.15-1.5 mmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
大鼠肝组织匀浆抽提液	不稀释	大鼠肾组织匀浆抽提液	不稀释
大鼠心组织匀浆抽提液	不稀释	小鼠肝组织匀浆抽提液	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

① 在进行组织样本处理时，离心后的上清液必须澄清。若有浑浊须将浑浊上清转移至新的离心管，再次离心。

② 试剂有刺激性气味，请在通风橱内操作。

③ 必须采用新鲜样本，检测必须在 24 h 内完成。

操作步骤

① 标准管：取 0.5 mL 不同浓度的标准品（建议做一个复孔），加入 1.5 mL 的 EP 管中。

测定管和对照管：取 0.5 mL 待测样本，加入至 1.5 mL EP 管中。

② 向步骤①中的标准管和测定管中加入 0.25 mL 试剂四，对照管中加入 0.25 mL 试剂三。

③ 涡旋充分震荡 3 min，室温静置 3 min。

④ 取 0.3 mL 上层液体于酶标板中，酶标仪，波长 715 nm，测定 OD 值。

操作表

	标准管	**测定管**	**对照管**
不同浓度的标准品(mL)	0.5		
待测样本(mL)		0.5	0.5
试剂三(mL)			0.25
试剂四(mL)	0.25	0.25	
涡旋充分震荡 3 min，室温静置 3 min，取上层液体 0.3 mL 于酶标板中，酶标仪，波长 715 nm，测定 OD 值。			

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

组织中 NEFA 含量计算公式：

$$\text{NEFA 含量 (μmol/g)} = (\triangle A_{715} - b) \div a \times \frac{V_1}{m} \times f$$

注解：

a：标曲斜率

b：标曲截距

y：标准品 OD 值-空白 OD 值

x：吸光度对应的浓度

ΔA_{715}：样本测定 OD 值-对照 OD 值

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

m：组织的鲜重，建议 m 取 0.1 g

V_1：组织处理过程中加入试剂一的体积，建议 V_1 取 1.2 mL

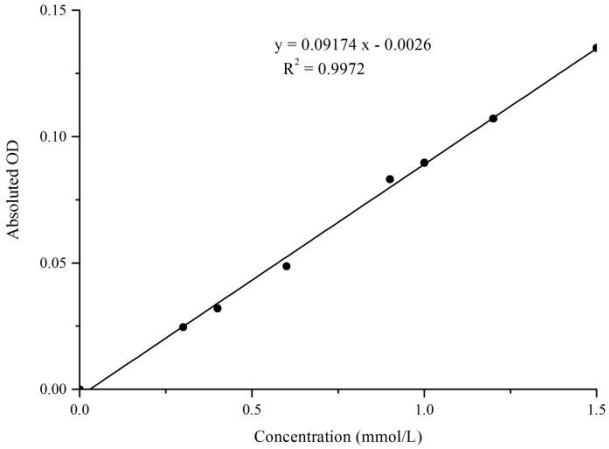
附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.15-1.5 mmol/L	**平均批间差**	5.1 %
灵敏度	0.15 mmol/L	**平均批内差**	3.3 %
平均回收率	101 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

绘制标曲(数据仅供参考):



附录2 实例分析

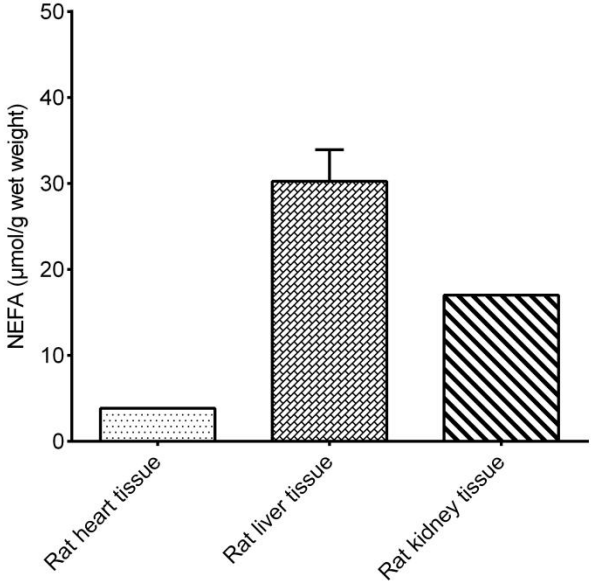
例如检测大鼠肝脏组织(数据仅供参考)：

取0.1 g大鼠肝组织，加入1.2 mL试剂一，于4℃，低温振荡器中震荡抽提2 h，4℃，10000 × g离心10 min，将上清用试剂一稀释3倍后，按操作表操作，结果如下：

标准曲线：y = 0.09174 x - 0.0026，测定管平均OD值为0.108，对照管平均OD值为0.049，计算结果为：

$$\text{NEFA 含量 (μmol/g)} = (0.108 - 0.049 + 0.0026) \div 0.09174 \times \frac{1.2}{0.1} \times 3 = 24.17\ \mu\text{mol/g}$$

按说明书操作，测定大鼠心脏组织（m=0.1 g，V_1=1.2 mL）、大鼠肝脏组织（m=0.1 g，V_1=1.2 mL）、大鼠肾脏组织（m=0.1 g，V_1=1.2 mL）中NEFA含量（如下图）：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	未严格按照说明书操作	严格按照说明书操作
样本测不出值	样本中 NEFA 含量较低	降低试剂一用量或增加样本量，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
出现绿色沉淀	样本浓度太高＞1.5 mmol/L	选择适当稀释倍数，重新检测
	检测环境温度过低	在室内温度在 25-30℃环境检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Bian Z , Xu C , Wang X ,et al.TRIM65/NF2/YAP1 Signaling Coordinately Orchestrates Metabolic and Immune Advantages in Hepatocellular Carcinoma[J].Advanced Science, 2024, 11(35).DOI:10.1002/advs.202402578.

2. Zhang X , Chen T , Li Z ,et al.NORAD exacerbates metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease development via the miR-511-3p/Rock2 axis and inhibits ubiquitin-mediated degradation of ROCK2[J].Metabolism, 2025, 164.DOI:10.1016/j.metabol.2024.156111.

3. Lin D , Fu X , Li B ,et al.Integrating untargeted and oxylipins-targeted metabolomics to reveal the anti-obesity and hypolipidemic mechanism of conjugated linoleic acid in high-fat diet rats[J].Journal of Functional Foods, 2024, 116.DOI:10.1016/j.jff.2024.106182.

4. Kang C , Xiao Q , Wang X ,et al.Chlormequat chloride induces hepatic steatosis by promoting mTOR/SREBP1 mediated lipogenesis via AMPK inhibition[J].Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 190:114790[2025-04-22].DOI:10.1016/j.fct.2024.114790.

5. Cai X , Zhang Q , Wang J ,et al.Novel Dual PPAR δ / γ Partial Agonist Induces Hepatic Lipid Accumulation through Direct Binding and Inhibition of AKT1 Phosphorylation, Mediating CD36 Upregulation[J].Chemical Research in Toxicology, 2024, 37(9):14.DOI:10.1021/acs.chemrestox.4c00268.

6. Fingerhut M A , Henrich L , Lauber C ,et al.Characterization of a GDS(L)-like hydrolase from Pleurotus sapidus with an unusual SGNH motif[J].AMB Express, 2024, 14(1):1-14.DOI:10.1186/s13568-024-01752-x.