

(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](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://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 ℃ 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 ℃ 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 ℃ 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 ℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	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  $\mu\text{L}$ ，200  $\mu\text{L}$ ，100  $\mu\text{L}$ ）

耗材：枪头（1000  $\mu\text{L}$ ，200  $\mu\text{L}$ ）、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 ( $\mu\text{L}$ )	0	45	60	90	135	150	180	225
试剂一( $\mu\text{L}$ )	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°C 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°C，低温振荡器中震荡抽提 2 h，4°C，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：

$$\text{NEFA 含量} \begin{matrix} (\mu\text{mol/g}) \end{matrix} = (\Delta A_{715} - b) \div a \times \frac{V_1}{m} \times f$$

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

$\Delta A_{715}$ ：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

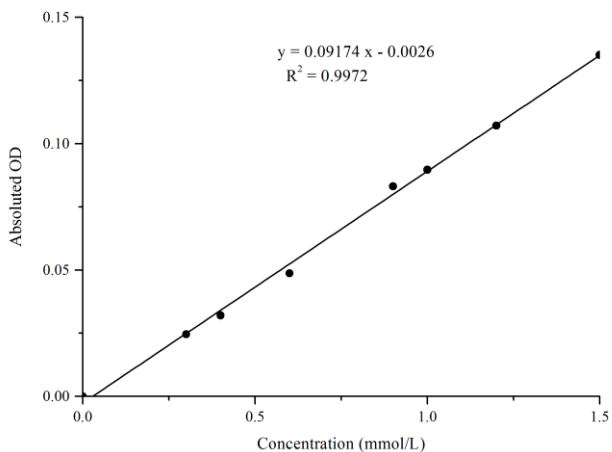
## 附录1 关键数据

### 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

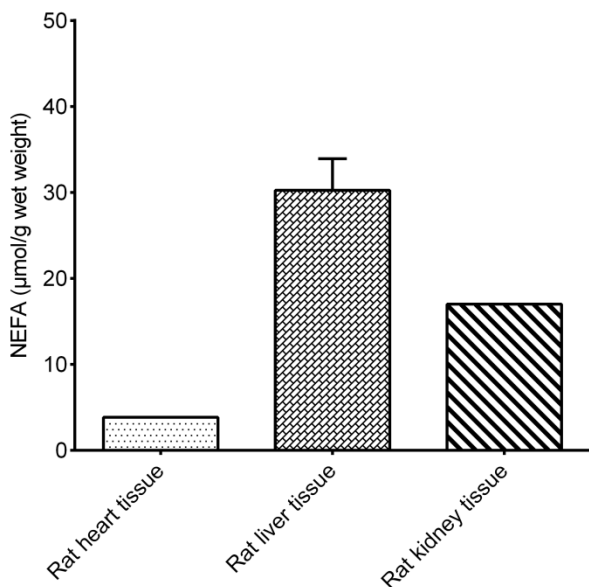
例如检测大鼠肝脏组织(数据仅供参考):

取0.1 g大鼠肝组织, 加入1.2 mL试剂一, 于4°C, 低温振荡器中震荡抽提2 h, 4°C, 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:  $y = 0.09174x - 0.0026$ , 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:

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

按说明书操作, 测定大鼠心脏组织 (m=0.1 g, V<sub>1</sub>=1.2 mL)、大鼠肝脏组织 (m=0.1 g, V<sub>1</sub>=1.2 mL)、大鼠肾脏组织 (m=0.1 g, V<sub>1</sub>=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°C 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. Peng Hao, Chen Binbin, Wei Wei et al. N-methyladenosine (m<sup>A</sup>) in 18S rRNA promotes fatty acid metabolism and oncogenic transformation.[J] .Nat Metab, 2022, 4: 1041-1054. IF:19.864
2. Inmaculada López-Almela, Marina Roman Pérez, Bullich-Vilarrubias C, et al. Bacteroides uniformis combined with fiber amplifies metabolic and immune benefits in obese mice[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1), 1865706. IF:10.245
3. Omar N, Frank J, Kruger J, et al. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or Without Added Fructooligosaccharides, on Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2021:2001133. IF:5.914
4. Zhu T, Wang Z, Zou T, et al. SOAT1 Promotes Gastric Cancer Lymph Node Metastasis Through Lipid Synthesis. Front Pharmacol. 2021; 12:769647. IF:5.81
5. Zeng X Peng, Wang L J, Guo L H, et al. Dasatinib ameliorates chronic pancreatitis induced by caerulein via anti- fibrotic and anti-inflammatory mechanism[J]. Pharmacological Research, 2019, 147, 104357. IF:5.574
6. Liu K , Zhao X , Qi X , et al. Design, synthesis, and biological evaluation of a novel dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist for the treatment of diabetic kidney disease through anti-inflammatory mechanisms[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 218, 113388. IF:5.572
7. Jung D S, Son Y J, Shin J M, et al. Gymnaster Koraiensis Extract Alleviated Metabolic Syndrome Symptoms and Stimulated UCP1 -Independent Energy Consumption via AMPK Activation in White Adipose Tissue[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2020. IF:5.309
8. Wang L J, He L, Hao L, et al. Isoliquiritigenin ameliorates caerulein-induced chronic pancreatitis by inhibiting the activation of PSCs and pancreatic infiltration of macrophages[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020. IF:4.486
9. Ar?can E Y, Kayal? D G, Karaca B U, et al. Reproductive effects of subchronic exposure to acetaminid in male rats[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1-10. IF:3.998
10. Luo Y, Qiao X, Ma Y, et al. Disordered metabolism in mice lacking irisin[J]. Scientific Reports, 2020, 10(2). IF:3.998
11. Wang C , Hu N H , Yu L Y , et al. 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside

- attenuates hepatic steatosis via IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B and Keap1-Nrf2 pathways in larval zebrafish[J]. *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY*, 2020, 127: 110138. IF:3.743
12. Yu H, Zhang L, Chen P, et al. Dietary bile acids enhance growth, and alleviate hepatic fibrosis induced by a high starch diet via AKT/FOXO1 and cAMP/AMPK/SREBP1 pathway in *Micropterus salmoides*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10. IF:3.367
  13. Gomaa A A, Farghaly H S M, Dalia A, et al. Inhibition of adiposity and related metabolic disturbances by polyphenol-rich extract of *Boswellia serrata* gum through alteration of adipo/cytokine profiles[J]. *Inflammopharmacology*, 2018: 1-11. IF:3.304
  14. ul Haq M E, Akash M S H, Rehman K, et al. Chronic exposure of bisphenol A impairs carbohydrate and lipid metabolism by altering corresponding enzymatic and metabolic pathways[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2020: 103387. IF:3.292
  15. Messiha B A S, Ali M R A, Khattab M M, et al. Perindopril ameliorates experimental Alzheimer's disease progression: role of amyloid  $\beta$  degradation, central estrogen receptor and hyperlipidemic-lipid raft signaling[J]. *Inflammopharmacology*, 2020. IF:3.283
  16. Kilany O E, Abdelrazek H M A, Aldayel T S, et al. Anti-obesity potential of *Moringa olifera* seed extract and lycopene on high fat diet induced obesity in male Sprague Dawley rats[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2020, 27(10): 2733-2746. IF:2.802
  17. Akinnuga A M, Siboto A, Khumalo B, et al. Bredemolic Acid Improves Cardiovascular Function and Attenuates Endothelial Dysfunction in Diet-Induced Prediabetes: Effects on Selected Markers[J]. *Cardiovascular Therapeutics*, 2020, 2020. IF:2.538
  18. Badmus O O, Sabinari I W, Olatunji L A. Dexamethasone increases renal free fatty acids and xanthine oxidase activity in female rats: could there be any gestational impact?[J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2020: 1-12. IF:2.405
  19. Gao G, Xie Z S, Li E W, et al. Dehydroabietic acid improves nonalcoholic fatty liver disease through activating the Keap1/Nrf2-ARE signaling pathway to reduce ferroptosis[J]. *Journal of Natural Medicines*, 2021:1-13. IF:2.343
  20. Wang F, Chen H, Chen Y, et al. Diet-induced obesity is associated with altered expression of sperm motility-related genes and testicular post-translational modifications in a mouse model[J]. *Theriogenology*, 2020. IF:2.094
  21. Akinnuga A M, Siboto A, Khumalo B, et al. Bredemolic Acid Ameliorates Selected Liver Function Biomarkers in a Diet-Induced Prediabetic Rat Model[J]. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2020, 2020. IF:2.055
  22. Rahman S U, Huang Y, Zhu L, et al. Tea polyphenols attenuate liver inflammation by

- modulating obesity-related genes and down-regulating COX-2 and iNOS expression in high fat-fed dogs[J]. *BMC Veterinary Research*, 2020, 16(1): 1-12. IF:1.835
23. Adeyemi W J, Abdussalam T A, Abdulrahim A, et al. Elevated, sustained, and yet reversible biotoxicity effects of lead on cessation of exposure: Melatonin is a potent therapeutic option[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2020, 36(7): 477-486. IF:1.708
  24. Hassan S, Moustafa A, Kabil S L, et al. Alagebrium Mitigates Metabolic Insults in High Carbohydrate and High Fat Diet Fed Wistar Rats[J]. *Pharmaceutical Sciences*, 2020, 26(1): 13-24. IF:1.24
  25. Dewi L, Lestari L A, Astiningrum A N, et al. The Alleviation Effect of Combination of Tempeh and Red Ginger Flour towards Insulin Sensitivity in High-Fat Diet Rats[J]. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2020, 8(1): 21-25. IF:0.756
  26. USLU H, USLU G A, ?ZEN H, et al. Effects of different doses of *Prunus laurocerasus* L. leaf extract on oxidative stress, hyperglycaemia and hyperlipidaemia induced by type I diabetes[J]. 2018.
  27. Olakanmi Bodun O, Olorundare Olufunke E, Afolabi Olanrewaju O, et al. Assessment of the Effects of Crude Methanolic Extracts (Leaf and Twig) of *Loranthus micranthus* on Streptozotocin Induced Diabetic Rats[J]. *Journal of Diabetes and Islet Biology*, 2020, 10: 2641-8975.
  28. Singh P, Garg R, Goand U K, et al. Combination of Pancreastatin inhibitor PSTi8 with metformin inhibits Fetuin-A in type 2 diabetic mice[J]. *Heliyon*, 2020, 6(10): e05133.
  29. Susilowati R, Setiawan A M. *Cinnamomum burmannii* (Nees & T. Nees) Blume and *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr. extract combination ameliorate lipid profile and heart oxidative stress in hyperlipidemic mice[J]. *Veterinary World*, 2020, 13(7): 1404.