

(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-K784-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(440-460 nm)

Elabscience®脂肪酸氧化 (FAO) 比色法测试盒

Fatty Acid Oxidation (FAO) 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和细胞样本的脂肪酸氧化（FAO）能力。

检测原理

脂肪酸氧化（FAO）是体内脂肪酸分解的主要途径，FAO可以供应机体所需要的大量能量。FAO也是脂肪酸的改造过程，机体所需要的脂肪酸链的长短不同，通过氧化可将长链脂肪酸改造成长度适宜的脂肪酸，供机体代谢所需。

本试剂盒的检测原理：FAO过程消耗底物和 NAD^+ ，生成NADH在电子偶联剂和显色剂的作用下生成橙红色物质，可在450 nm处检测，通过测定体系OD值可反映出样本的FAO能力。

本试剂盒检测动物组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司BCA试剂盒(货号E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	40 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	辅因子 (Co-factor)	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	0.22 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	1.2 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	标准品 (Standard)	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	酶标板	96 孔	无要求
	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(440-460 nm，最佳检测波长 450 nm)、37°C 恒温箱

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25°C。

② 试剂二工作液的配制：

取一支试剂二加入1 mL试剂一溶解，置于冰上避光待用，未用完的工作液-20°C避光保存，3天内使用有效。

③ 试剂三工作液的配制：

按照试剂一：试剂三 = 4 : 1 的体积比混匀，按需配制，避光置于冰上待用，未用完的工作液-20°C 避光保存，3 天内使用有效。

④ 反应工作液的配制：

按照试剂一：试剂二工作液 = 72 : 5 的体积比混匀，现配现用，按需配制，避光置于冰上待用，当天使用有效。

⑤ 0.5 mmol/L 标准品的配制：

取一支试剂五使用 5 mL 双蒸水溶解得到 0.5 mmol/L 的标准品，避光置于冰上待用，未用完的标准品溶液-20°C 避光保存，3 天内使用有效。

⑥ 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	0.1	0.15	0.2	0.3	0.4	0.45	0.5
0.5 mmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	120	160	180	200
双蒸水(μL)	200	160	140	120	80	40	20	0

样本准备

① 样本处理

组织样本:按照组织样本质量(g):生理盐水体积(mL)=1:9的比例匀浆(如0.1 g组织样本,加入0.9 mL生理盐水)。匀浆后,4°C,10000 × g,离心15 min,取上清置于冰盒上待测,留取部分上清进行蛋白浓度测定,制备好的组织上清在4 h内检测为宜。

细胞样本:取 1×10^6 个细胞离心后弃上清,每次加入200 μL生理盐水,清洗三次。清洗完成后再加入200 μL生理盐水匀浆后,4°C,10000 × g离心15 min,取上清置于冰上待测,留取部分上清进行蛋白浓度测定,制备好的细胞上清在4 h内检测为宜。

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:0.11 - 8.33 U/L,请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	2-5	10%小鼠肾组织	2-5
10%小鼠脑组织	不稀释	10%小鼠心脏组织	2-3
10%小鼠肺组织	不稀释	10%小鼠肌肉组织	1-3
10%小鼠脾脏组织	不稀释	HL-60 细胞(1×10^6)	不稀释
Molt-4 细胞(1×10^6)	不稀释	Jurkat 细胞(1×10^6)	不稀释

注:稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

若样本测定 OD 值大于 1.5,则需要稀释样本。

操作步骤

- ① 标准孔：取 50 μL 不同浓度标准品加入相应的标准孔中。
测定孔：取 50 μL 待测样本加入相应的测定孔中。
对照孔：取 50 μL 待测样本加入相应的对照孔中。
- ② 向步骤①中的标准孔中加入 165 μL 的试剂一；向步骤①中的测定孔加入 20 μL 试剂三工作液；向步骤①中的对照孔中加入 20 μL 试剂一。
- ③ 向步骤②中的测定和对照孔中加入 145 μL 的反应工作液。
- ④ 向步骤③各孔中加入 20 μL 的试剂四。
- ⑤ 振板 5 s, 37°C 孵育 30 min。酶标仪于 450 nm 处检测各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度标准品(μL)	50	--	--
待测样本(μL)	--	50	50
试剂一(μL)	165	--	20
试剂三工作液(μL)	--	20	--
反应工作液(μL)	--	145	145
试剂四(μL)	20	20	20
振板 5 s, 37°C 孵育 30 min。酶标仪于 450 nm 处检测各孔 OD 值。			

本试剂盒检测动物组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：E-BC-K318-M）。

结果计算

标准曲线: $y = ax + b$

组织或细胞样本中脂肪酸氧化(FAO)能力计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每克组织或细胞蛋白每分钟生成 1 μmol NADH 所需酶活为 1 个脂肪酸氧化单位。

$$\text{FAO 能力(U/gprot)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \times 1000 \div C_{\text{pr}} \times f$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值 (标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标准曲线的斜率

b: 标准曲线的截距

ΔA_{450} : 测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

T: 反应时间, 30 min

1000: $1 \text{ mmol/L} = 1000 \mu\text{mol/L}$

C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度, gprot/L

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

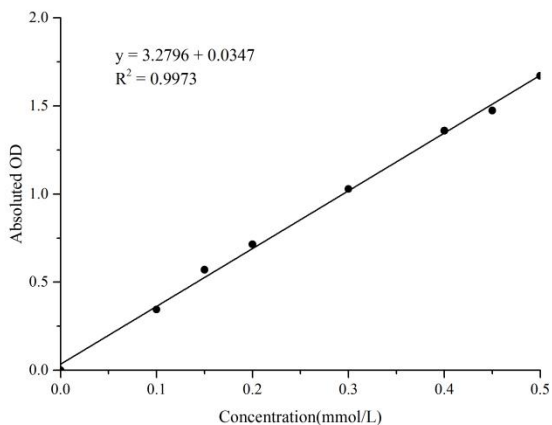
检测范围	0.11-8.33 U/L	批间差	8.2-9.4%
灵敏度	0.11 U/L	批内差	4.1-5.0%
稀释回收率	100-110%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度的标准品加样量为50 μL ，按照操作表进行操作记录OD值，结果如下：

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.1	0.15	0.2	0.3	0.4	0.45	0.5
OD 值	0.05	0.425	0.615	0.763	1.003	1.41	1.534	1.716
	0.05	0.365	0.626	0.766	1.154	1.41	1.513	1.726
平均 OD 值	0.050	0.395	0.621	0.765	1.079	1.410	1.524	1.721
绝对 OD 值	0.000	0.345	0.571	0.715	1.029	1.360	1.474	1.671

② 绘制标准曲线，如下图所示：



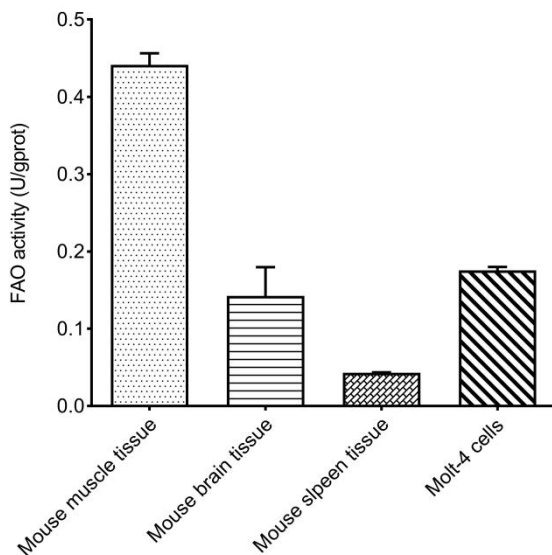
附录2 实例分析

例如小鼠肌肉组织(数据仅供参考):

取50 μL 10%小鼠肌肉组织匀浆的上清液加入到酶标板孔中,按操作表操作,结果如下:标准曲线为 $y = 3.2796x + 0.0347$;测定孔OD值为1.860,对照孔OD值为1.600; $\Delta A_{450} = 1.860 - 1.600 = 0.260$,10%小鼠肌肉组织匀浆蛋白含量为5.201 gprot/L,计算结果为:

$$\text{FAO 能力 (U/gprot)} = (0.260 - 0.0347) \div 3.2796 \div 30 \times 1000 \div 5.201 = 0.44 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作,测定小鼠肌肉组织样本(10%组织匀浆蛋白含量为5.201 gprot/L,不稀释,加样量50 μL)、小鼠脑组织(10%组织匀浆蛋白含量为3.931 gprot/L,不稀释,加样量50 μL)、小鼠脾脏组织(10%组织匀浆蛋白含量为8.297 gprot/L,不稀释,加样量50 μL)、Molt-4细胞(1×10^6 个细胞蛋白含量为0.165 gprot/L,不稀释,加样量50 μL) 脂肪酸氧化能力(如下图):



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。

