

(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-F039

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 590 nm)

Elabscience®游离脂肪酸(NEFA/FFA)荧光测定试剂盒

Free Fatty Acids (NEFA/FFA) Fluorometric 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血清、血浆、动物组织、细胞样本中的游离脂肪酸的含量。

检测原理

游离脂肪酸在酰基合成酶的作用下生成酰基辅酶 A，酰基辅酶 A 在酰基氧化酶的氧化作用下生成过氧化氢。过氧化氢在酶和探针的存在下反应，产生的荧光物质在激发波长 535 nm 和发射波长 590 nm 处的荧光强度与游离脂肪酸浓度成正比。

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

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)	缓冲液 (Buffer Solution)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.06 mL×1 支	0.12 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 1 (Enzyme Reagent 1)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 2 (Enzyme Reagent 2)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	清除剂 (Scavenger)	0.6 mL×1 支	1.2 mL×1 支	-20℃ 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	1 mmol/L 标准品 (1 mmol/L Standard Solution)	0.4 mL×1 支	0.4 mL×1 支	-20℃ 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	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: 荧光酶标仪(激发波长 535 nm, 发射波长 590 nm)

试剂准备

① 检测前, 试剂平衡至室温。

② 试剂三应用液的配制:

每支试剂三粉剂加入3 mL试剂一溶解, 混匀, -20℃避光保存1个月。

③ 试剂四应用液的配制:

每支试剂四粉剂加入300 μL试剂一溶解, 混匀, -20℃避光保存1个月。

④ 显色剂的配制:

按试剂一: 试剂二: 试剂四应用液: 试剂五= 34: 1: 5: 10的比例配制, 混匀, 现用现配, 按需配制, 避光保存。

⑤ 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(μmol/L)	0	10	20	40	50	60	80	100
1 mmol/L 标准品(μL)	0	5	10	20	25	30	40	50
试剂一(μL)	500	495	490	480	475	470	460	450

样本准备

① 样本处理

血清血浆样本：可直接测定。

组织样本：按照组织样本质量(g)：试剂一体积(mL)=1：9 的比例匀浆，12000 ×g，4°C 离心 10 min，取上清待测，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：取 2×10^6 细胞加入 100 μ L 试剂一进行超声破碎，然后 12000 ×g，4°C 离心 10 min，取上清待测，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

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：1.20-100 μ mol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	10-20	10%大鼠肝	20-40
大鼠血清	20-40	10%小鼠肾	20-40
小鼠血浆	10-30	10%大鼠脑	20-40
兔血清	10-30	10%大鼠肺	20-40

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

① 试剂二，试剂三应用液及试剂四应用液避免反复冻融，可分装后-20°C 保存。

② 显色剂配制完成后，必须避光。

操作步骤

- ① 标准孔:取 10 μL 不同浓度的标准品溶液,分别加入相应的酶标孔中。
测定孔: 取 10 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向标准孔, 测定孔各加入 50 μL 试剂三应用液。
- ③ 酶标仪上振板 10 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min。
- ④ 向步骤③中的标准孔, 测定孔加入 50 μL 显色剂。
- ⑤ 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min。
- ⑥ 荧光酶标仪上设置激发波长 535 nm, 发射波长 590 nm, 测定各孔荧光值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品(μL)	10	--
待测样本(μL)	--	10
试剂三应用液(μL)	50	50
酶标仪上振板 10 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min		
显色剂(μL)	50	50
37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min		
荧光酶标仪上设置激发波长 535 nm, 发射波长 590 nm, 测定各孔荧光值。		

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

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

血清(浆)游离脂肪酸的计算:

$$\text{游离脂肪酸含量} = (\Delta F - b) \div a \times f$$

($\mu\text{mol/L}$)

组织、细胞中游离脂肪酸的计算::

$$\text{游离脂肪酸含量} = (\Delta F - b) \div a \times f \div C_{\text{pr}}$$

($\mu\text{mol/gprot}$)

注解:

y: 标准品的绝对荧光值 (标准孔荧光值-空白荧光值, 空白荧光值是标准品浓度为 0 时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔF : 样本的绝对荧光值 (测定孔荧光值-空白荧光值)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 样本加入检测体系前的蛋白浓度

附录1 关键数据

1. 技术参数

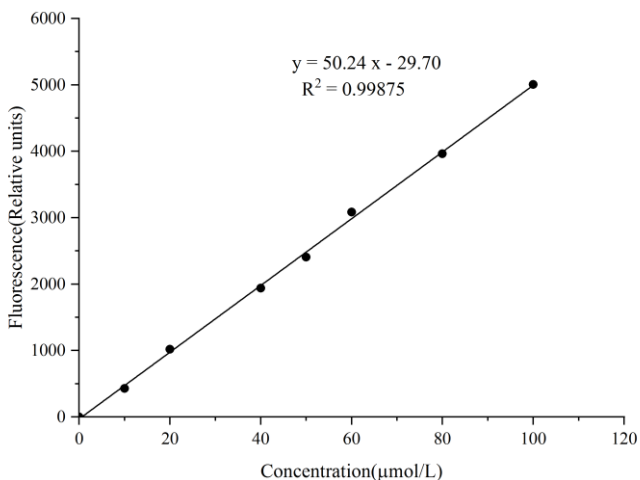
检测范围	1.20-100 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	5.1 %
灵敏度	1.20 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	4.1 %
平均回收率	98 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量10 μL , 按照操作步骤进行实验, 荧光值如下表所示:

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	10	20	40	50	60	80	100
荧光值	333	782	1351	2273	2696	3346	4261	5264
	351	761	1374	2290	2802	3506	4349	5430
平均荧光值	342	772	1362	2282	2749	3426	4305	5347
绝对荧光值	0	430	1020	1940	2407	3084	3963	5005

②绘制标曲(如下图):



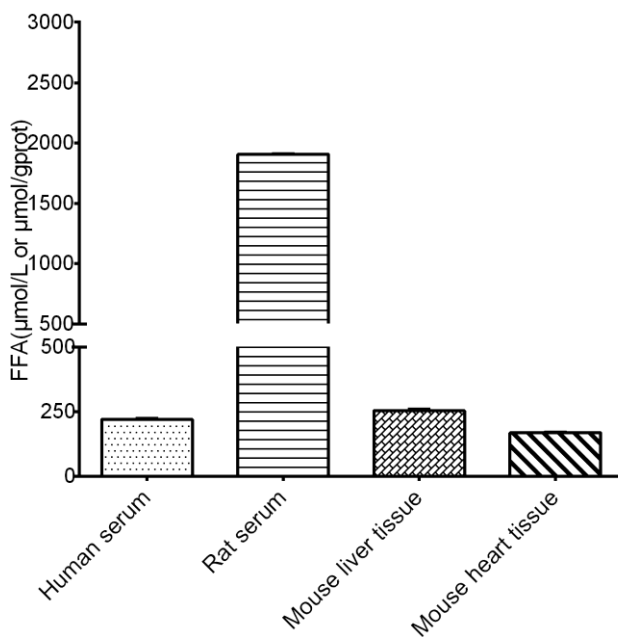
附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考):

用试剂一将人血清稀释20倍,取10 μL 稀释后样本按操作表检测,结果如下:标准曲线为 $y = 50.24x - 29.7$,测定孔平均荧光值为1008,空白孔平均荧光值为492,计算结果为:

$$\text{游离脂肪酸含量} = (1008 - 492 + 29.7) \div 50.24 \times 20 = 217.23 \mu\text{mol/L} (\mu\text{mol/L})$$

按照说明书操作,测定人血清(稀释20倍,加样量10 μL)、大鼠血清(稀释40倍,加样量10 μL)、小鼠肝组织(10%组织匀浆的蛋白含量11.22 g/L,稀释30倍,加样量10 μL)、小鼠心组织(10%组织匀浆3.76 g/L,稀释30倍,加样量10 μL)中游离脂肪酸含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
标准品不成线性	标准品浓度稀释错误	按照标准品稀释表重新稀释标准品
	计算错误	按照计算公式进行计算
	使用过期的试剂	选择在保质期内的试剂
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数,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
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长
	试剂二未完全解冻	37°C使试剂二完全解冻

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 (mA) 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 acetamiprid 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 β /NF- κ 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. Gomma 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 β 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

