

(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-K792-M

产品规格: 48 T(44 samples)/96 T(92 samples)

检测仪器: 酶标仪 (540-550 nm)

Elabscience®游离脂肪酸(NEFA/FFA)

比色法测试盒(酶法)

Free Fatty Acids (NEFA/FFA) Colorimetric Assay Kit (Enzyme Method)

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(浆)、动物组织、细胞样本中的游离脂肪酸 (NEFA/FFA) 含量。

检测原理

游离脂肪酸(NEFA/FFA)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。过氧化氢在酶和色原的存在下反应，生成红色物质，在 546 nm 处有最大吸收，颜色深浅与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)	酶稀释液 (Enzyme Diluent)	12 mL×1 瓶	24 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20℃避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	1 mmol/L 标准品 (1 mmol/L Standard)	0.2 mL×1 支	0.2 mL×1 支	2-8℃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(540 nm-550 nm，最佳检测波长为 546 nm)

试剂准备

- ① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。
- ② 试剂二工作液的配制：
取一支试剂二，用6 mL试剂一溶解，每次使用前在37℃条件下孵育 5 min，未用完部分，可2-8℃避光保存5天。
- ③ 试剂四每次使用前在37℃条件下孵育5 min。

样本准备

- ① 样本处理
血清血浆等液体样本：可直接测定。
组织样本：按照组织样本质量(g)：生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)=1: 9 比例匀浆，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。
细胞样本：取 3×10⁶ 个细胞加入 150 μL 生理盐水（0.9% NaCl）进行匀浆，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。
- 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：0.07-2 mmol/L，不同样本稀释比例如下表(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	1-2	10%大鼠肝组织	1-4
小鼠血清	4-6	10%小鼠肝组织	1-4
大鼠血清	4-6	10%大鼠心组织	不稀释
牛血清	1-2	3*10 ⁶ 个 293T 细胞	不稀释

注：稀释液为生理盐水（0.9% NaCl）。

操作步骤

- ① 空白孔：取 10 μL 双蒸水，加入到空白孔中
标准孔：取 10 μL 1 mmol/L 的标准品，加入到标准孔中。
测定孔：取 10 μL 样本，加入到对应的测定孔中。
- ② 向步骤①空白孔、标准孔、测定孔加入 200 μL 试剂二工作液。
- ③ 酶标仪上振板 10 s，37℃ 反应 5 min；
- ④ 向③中各孔加入 50 μL 试剂三；
- ⑤ 酶标仪上振板 10 s，酶标仪 546 nm 处，测定各孔 OD 值 A_1 ；37℃ 反应 5 min，酶标仪 546 nm 处，测定各孔 OD 值 A_2 ， $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

操作表

	空白孔	标准孔	测定孔
双蒸水(μL)	10	--	--
1 mmol/L 标准品(μL)	--	10	--
待测样本(μL)	--	--	10
试剂二工作液(μL)	200	200	200
酶标仪上振板 10 s，37℃ 反应 5 min			
试剂三(μL)	50	50	50
酶标仪上振板 10 s，酶标仪 546 nm 处，测定各孔 OD 值 A_1 。37℃ 反应 5 min，酶标仪 546 nm 处，测定各孔 OD 值 A_2 ， $\Delta A = A_2 - A_1$ 。			

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

血清(浆)中游离脂肪酸(NEFA/FFA)含量计算公式:

$$\text{NEFA/FFA 含量 (mmol/L)} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times 1^* \times f$$

组织、细胞中游离脂肪酸含量计算公式:

$$\text{NEFA/FFA 含量 (mmol/gprot)} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times 1^* \times f \div C_{\text{pr}}$$

注解:

$\Delta A_{\text{空白}}$: 空白孔变化 OD 值 ($A_2 - A_1$)

$\Delta A_{\text{标准}}$: 标准孔变化 OD 值 ($A_2 - A_1$)

$\Delta A_{\text{测定}}$: 样本孔变化 OD 值 ($A_2 - A_1$)

1^* : 标准品浓度 1 mmol/L

f : 样本加入检测体系前的稀释倍数

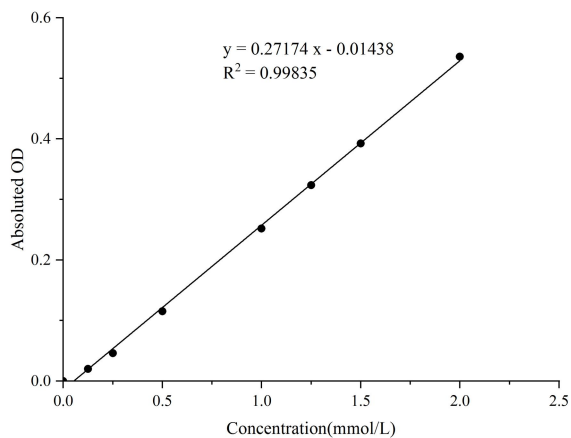
C_{pr} : 样本的蛋白浓度, gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.07-2 mmol/L	批间差	2.5-6.1 %
灵敏度	0.07 mmol/L	批内差	1.5-4.5 %
加标回收率	95-101 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)



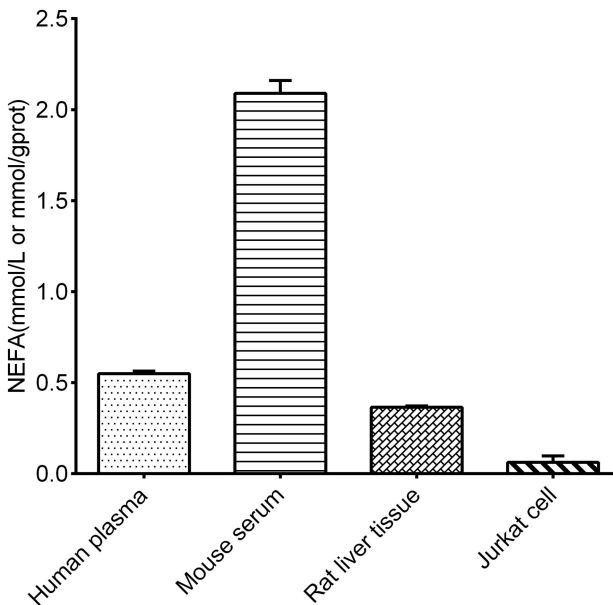
附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考):

取10 μL 人血清,按照说明书操作,结果如下:标准孔 $\Delta A = 0.310 - 0.045 = 0.265$,测定孔 $\Delta A = 0.202 - 0.046 = 0.156$,空白孔 $\Delta A = 0.114 - 0.044 = 0.070$,计算结果为:

$$\text{游离脂肪酸含量} = (0.156 - 0.070) \div (0.265 - 0.070) \times 1 = 0.44 \text{ mmol/L} \\ (\text{mmol/L})$$

按照操作过程,测定人血浆(加样量10 μL)、小鼠血清(加样量10 μL)、大鼠肝组织(10%组织匀浆的蛋白含量11.56 gprot/L,稀释2倍,加样量10 μL)、Jurkat细胞(3×10^6 个细胞匀浆的蛋白含量2.38 gprot/L,加样量10 μL)中游离脂肪酸 (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
测值不稳定，复孔差异大	加入的物质部分黏在枪头上	触板底加入样本
	样本未完全混匀	增加振板时间
	加入液体时产生气泡	小心吸打，若产生气泡，用新的枪头吹破或尖锐物戳破

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。