

CheKine™ 游离脂肪酸（FFA/NEFA）含量检测试剂盒（酶法）

货号: KTB2231

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 血清（浆）、动植物组织、细胞
	保质期: -20℃, 避光保存 6 个月

01 背景与原理

游离脂肪酸（NEFA）是脂肪组织脂解的主要产物，血清水平可直接反映机体脂质代谢状态。血清 NEFA 升高与胰岛素抵抗、II 型糖尿病、肥胖及心血管疾病密切相关；降低则表明内分泌功能减退。因此，NEFA 检测是脂代谢紊乱筛查和病情监测的重要指标。

本试剂盒采用酶偶联比色法。样本中的游离脂肪酸在乙酰辅酶 A 合成酶（ACS）作用下生成乙酰辅酶 A，后者经乙酰辅酶 A 氧化酶（ACOD）氧化产生过氧化氢。在过氧化物酶（POD）催化下，过氧化氢与色原底物偶联生成紫色醌类染料。该染料在 546 nm 处的吸光度与样本中游离脂肪酸浓度成正比。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Reagent I	12 mL	24 mL	-20℃, 避光保存
Reagent II	3 mL	6 mL	-20℃, 避光保存
Reagent III	0.5 mL	1 mL	-20℃, 避光保存
Standard	0.5 mL	0.5 mL	-20℃

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 546 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水、PBS（1×，pH 7.4）	提取样本用
其他	匀浆器（组织样本）、超声破碎仪（细胞样本）、低温离心机、水浴锅、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

注意：各小体积组分开盖前，请先低速离心。

试剂名称	试剂准备	注意事项
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	-20℃，避光保存
Reagent II	即用型；使用前平衡到室温	-20℃，避光保存
Reagent III	即用型；使用前平衡到室温	试剂易挥发，每次使用后注意密封。 -20℃，避光保存
1 mmol/L Standard	即用型；使用前平衡到室温	-20℃

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。血清（浆）样本尽量采集后当天检测，如果不能当天检测，则保存在-80℃，一个月内使用。样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把完整细胞或者分装的组织块保存在-80℃，一个月内使用。当准备好进行该项实验时，将样本从-80℃拿出后，在冰上解冻。但是请注意，这可能会影响样本的稳定性，实验结果可能会低于预期。样本匀浆后的上清尽快检测，确保测值的准确性。

- 血清（浆）样本：采集后需及时分离血清或血浆，避免溶血。
- 动植物组织样本：称取 0.1 g 组织样本，按照组织质量(g)：PBS（1×，pH 7.4）体积(mL)为 1：9 的比例，加入 0.9 mL PBS（1×，pH 7.4），冰浴匀浆。4℃，10000 g 离心 10 min，取上清，置于冰上待测。
- 细胞样本：收集 5×10⁶ 个细胞到离心管内，用 PBS（1×，pH 7.4）清洗细胞，离心后弃上清，加入 0.2 mL PBS（1×，pH 7.4），冰浴超声破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），10000 g，

4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。

05-3 实验步骤

- 1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 546 nm。
- 2. 工作液的配制：临用前配制，现配现用。对于 96 孔板，每孔配制 52μL 工作液。吸取 48 μL Reagent II 和 4 μL Reagent III 混匀，配制体积比 12：1。
- 3. 检测体系配制：标准孔和空白孔只需做 1 次。在 96 孔板中按照如下方式操作

试剂	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)	测定孔 (μL)
去离子水	10	0	0
1 mmol/L Standard	0	10	0
样本	0	0	10
Reagent I	200	200	200
混匀，37℃孵育 5 min，测定 546 nm 处的吸光值，分别标记为 A _{1 空白} 、A _{1 标准} 、A _{1 测定} 。			
工作液	50	50	50
混匀，37℃孵育 5 min，测定 546 nm 处的吸光值，分别标记为 A _{2 空白} 、A _{2 标准} 、A _{2 测定} 。			

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn) > 进入“技术中心”> 查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{\text{空白}} = A_{2 \text{ 空白}} - A_{1 \text{ 空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{2 \text{ 标准}} - A_{1 \text{ 标准}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{2 \text{ 测定}} - A_{1 \text{ 测定}}$ 。

2. 样本 NEFA 含量计算

● 按血清（浆）计算：

$NEFA \text{ (mmol/L)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标准}} \times n = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times n$

● 按组织样本质量计算：

$NEFA \text{ (μmol/g)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标准}} \div W \times V_{\text{提取}} \times n = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times 0.9 \div W \times n$

● 按细胞数量计算：

$NEFA \text{ (μmol/10}^6\text{)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标准}} \div N \times V_{\text{提取}} \times n = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times 0.2 \div N \times n$

● 按样本蛋白浓度计算：

$NEFA \text{ (mmol/g prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times n = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times n$

C_{标准}：标准品浓度，1 mmol/L=1 μmol/mL；V_{提取}：提取液 PBS（1×，pH 7.4）总体积，组织样本为 0.9 mL，细胞样本为 0.2 mL；W：样本质量，g；N：细胞数量，以 10⁶ 为单位（例如细胞数量为 5×10⁶，N=5）；C_{pr}：样本蛋白质浓度，g/L；n：稀释倍数。

07 结果展示

示例-1: 取 0.1g 小鼠肝脏样本，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{空白}}=A_{2\text{ 空白}}-A_{1\text{ 空白}}=0.067-0.043=0.024$ ， $\Delta A_{\text{标准}}=A_{2\text{ 标准}}-A_{1\text{ 标准}}=0.323-0.043=0.280$ ， $\Delta A_{\text{测定}}=A_{2\text{ 测定}}-A_{1\text{ 测定}}=0.142-0.083=0.059$ ，代入上述公式，计算 $NEFA(\mu\text{mol/g})=(0.059-0.024)\div(0.280-0.024)\times0.9\div0.1\times1=1.23\ \mu\text{mol/g}$ 。

08 FAQ

- 检测得到的样本 $\Delta A_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办？
如果样本的 $\Delta A_{\text{测定}}$ 高于 0.56，将样本用 PBS（1×，pH 7.4）进行稀释后，再进行实验，结果乘以稀释倍数。如果样本 $\Delta A_{\text{测定}}$ 低于 0.01，可适当增加样本量，或者减小提取液 PBS（1×，pH 7.4）的用量再重新进行测定。
- 如果样本量太小怎么办？
建议正式实验前选 2-3 个样本稀释后检测，如果稀释后的样本 $\Delta A_{\text{测定}} > 0.01$ ，则可以采用稀释的方式减小样本用量。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB2200	CheKine™ 甘油三酯（TG）检测试剂盒（微量法）
KTB2220	CheKine™ 总胆固醇（TC）检测试剂盒（微量法）
KTB2260	CheKine™ 低密度脂蛋白（LDL-C）含量检测试剂盒（微量法）
KTB2250	CheKine™ 高密度脂蛋白（HDL-C）含量检测试剂盒（微量法）
KTB2302	CheKine™ 丙氨酸氨基转移酶（谷丙转氨酶/ALT/GPT）活性检测试剂盒（IFCC 速率法）
KTB2303	CheKine™ 天门冬氨酸氨基转移酶（谷草转氨酶/AST/GOT）活性检测试剂盒（IFCC 速率法）

CheKine™ 游离脂肪酸（FFA/NEFA）含量检测流程示意图（酶法）

(Abbking 货号：KTB2231)

