**游离脂肪酸（FFA）含量测定试剂盒说明书（货号：PYB2044,规格:96T）**

1. **实验原理：**

 游离脂肪酸（Non-esterifiedfattyacids，NEFA）和辅酶A在乙酰辅酶A合成酶(ACS)的作用下反应生成乙酰辅酶A。乙酰辅酶A在乙酰辅酶A氧化酶（ACOD）的作用下生成H2O2，然后通过色原在过氧化物酶（POD）的作用下生成有色底物。

POD

ACOD

ACSL

游离脂肪酸+辅酶A+ATP 乙酰辅酶A+AMP+PPi，乙酰辅酶A+O2 2,3-反烯脂酰辅酶A+H2O2，2 H2O2+4-AAP+TOOS 染料+4H2O

 **二、试剂组份**：

 试剂一：沉淀剂，20mL×1瓶，室温保存。此为过饱和溶液，如有结晶，则取上清进行实验。

 试剂二：缓冲液，20mL×1瓶，2～8℃保存。

 试剂三：显色剂，5mL×1瓶，2～8℃避光保存。

 试剂四：标准品溶剂贮备液，10mL×1瓶（温度较低时可能会有结晶产生，此时可将试剂37℃融化后使用），2～8℃保存；临用前将标准品溶剂贮备液：双蒸水=1：9稀释成GSH标准品溶剂应用液。

 试剂五：GSH标准品粉剂，3.07mg/支×3支，2～8℃保存。测定前将一支GSH标准品用10mL标准品溶剂应用液溶解，配成1mmol/LGSH标准液（2℃～8℃可保存1~2周）；再取此1mmol/LGSH标准液0.2mL加标准品溶剂应用液9.8mL配成20μmol/LGSH标准液（现用现配）。注：GSH的分子量为307。另附送96孔板一块。所需试剂和试剂: 蒸馏水、生理盐水（或 PBS（0.1M））、电子秤（毫克级）

1. **使用步骤：**

样本要求：

 血液采集后需及时分离血清或血浆，避免溶血，最好立即检测（因游离脂肪酸的浓度会由于脂降解作用升高）。组织样本：准确称取组织重量，按重量（g）:体积(mL)=1:9的比例，加入9倍体积的生理盐水，冰水浴条件下机械匀浆，制成10%的匀浆，2500转/分，离心10分钟，取上清测定。细胞样本需收好破碎后制成匀浆液进行测定，细胞培养上清可直接进行实验。

标本2～8℃稳定3天（血清、浆），如标本不能立即检测，需将样本置于-20℃或更低温度保存（组织或细胞样本制成匀浆后需当天进行检测）。不可使用肝素抗凝的血浆样本。（液体样本有血清（浆）、培养液等，固体样本有动植物组织、细胞等）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  孔别加入物 | 空白 | 校准 | 样本 |
| 双蒸水 | 4µL |  |  |
| 标准品 |  | 4µL |  |
| 样品 |  |  | 4µL |
| 试剂一 | 200µL | 200µL | 200µL |
| 混匀，37℃孵育5min，读取吸光度值A1 |
| 试剂二 | 50µL | 50µL | 50µL |
| 混匀，37℃孵育5min，读取吸光度值A2，计算△A=A2-A1 |

计算公式：

△A样本-△A空白

液体样本NEFA含量（mmol/L）= ×C标准

△A标准-△A空白

△A样本-△A空白

△A样本-△A空白

固体样本NEFA含量（mmol/gprot）= ×C标准÷Cpr

**C**校准:标准品浓度,1.00mmol/L(具体浓度见标签);

**Cpr**:组织(细胞)匀浆蛋白浓度,gprot/L(prot指蛋白)。

注意事项:

1.酶标仪操作时可只用主波长，孔板里不要加入气泡。

2.样本浓度超过线性范围时，请用生理盐水将标本稀释，测定结果乘以稀释倍数。

3.如仪器内无本试剂盒所要求的波长，选择接近的波长（原则上偏差不超过10nm）。不同批次的试剂不推荐混合使用。

4.试剂盒中部分原料来源于动物和微生物，使用时请做好防护措施并严格执行实验操作规程，废液按环保要求处理。

5.样本没有尽快检测的，脂降解作用会导致结果偏高。血液中游离脂肪酸具有个体差异，进食后会升高。