

# 游离脂肪酸 (NEFA) 测定试剂盒

(货号: BC151 比色法 50 管/48 样)

## 一、测定原理:

游离脂肪酸 (NEFA) 能与铜离子结合形成脂肪酸的铜盐而溶于氯仿中, 其含量与游离脂肪酸含量成正比。用铜试剂测定其中铜离子的含量, 即可推算出游离脂肪酸的含量。

## 二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 3 个月)

**试剂一:** 氯仿 (三氯甲烷, 分析纯), 自备。

**试剂二:** 缓冲液, 40mL×1 瓶, 室温保存。

**试剂三:** 铜试剂, 甲液 30mL×1 瓶, 乙液 30mL×1 瓶, 丙液 5mL×1 瓶, 4°C 保存。**试剂三铜试剂的配制:** 按甲液: 乙液: 丙液=10: 9: 1 的比例进行配制, 需多少配多少, 配好后 4°C 可保存二周。

**试剂四:** 显色剂, 粉剂×2 支, 稀释液 10mL×2 瓶, 4°C 保存。**试剂四显色剂的配制:** 临用时将 1 支粉剂溶解于 1 瓶 10mL 稀释液中, 配好后 4°C 可保存二周。

**试剂五:** 棕榈酸标准品粉剂×2 支, 溶剂 50mL×1 瓶, 4°C 保存。**1000μmol/L 棕榈酸标准品的配制:** 将一支粉剂用溶剂溶解后定容至 20mL (注意用溶剂将装粉剂的小离心管洗净)。

**试剂六:** 双蒸水 40mL×1 瓶 (做空白管用)。

## 三、操作步骤:

1、分别取试管进行编号 (最好用带盖的磨口玻璃试管进行实验, 防止试剂挥发及更好的抽提)。

2、操作表:

|  | 空白管  | 标准管  | 测定管  |
|--|------|------|------|
| 双蒸水 (mL)   | 0.2  | 0.2  |      |
| 1000μmol/L 棕榈酸标准品 (mL)   |      | 0.2  |      |
| 待测样本 (mL)  |      |      | 0.2  |
| 试剂二缓冲液 (mL)  | 0.5  | 0.5  | 0.5  |
| 试剂三铜试剂 (mL)  | 1.0  | 1.0  | 1.0  |
| 三氯甲烷 (mL)  | 4.0  | 3.8  | 4.0  |
| 充分混匀抽提 2 分钟, 3500 转/分离心 10 分钟, 仔细吸去上层蓝色液体及蛋白凝块弃之, 吸取下层抽提液 2mL 进行显色。 <b>详细操作见注。</b> |      |      |      |
| 下层抽提液 (mL)   | 2.0  | 2.0  | 2.0  |
| 显色剂 (mL)   | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| 混匀, 室温放置 2 分钟, 在 440nm, 1cm 光径, 三氯甲烷调零后比色  |      |      |      |

[注]: 详细操作步骤:

1、充分混匀 1~2 分钟 (混到管内溶液不分层即可)。如果您没有磨口试管, 可用一次性 10mL 离心管代替 (用前需将离心管加氯仿测试其是否发生反应)。

2、混匀完后以 3500 转/分离心 10 分钟, 若发现下层液体呈半凝固状态、凝固层较厚或下层液体不足 2mL 时, 则可用小玻棒或移液器吸嘴轻轻搅拌后再次离心, 直至分层

清楚。

- 3、然后用移液器小心吸取上层液体及凝固层并弃之。
- 4、取注射器及硬膜外麻醉针心针套，将硬膜外麻醉针心插入针套中，小心插入下层抽提液中，拔出针心，接上注射器，吸取下层抽提液 2.3~2.5mL 至另一试管中。（这样可避免上层液体及凝固层混入下层液体中，若混入上层液体及凝固层，则需重新离心后再取下层抽提液，否则会影响结果。）若偶然发现抽提液有雾状混浊，可放入 37°C 水浴 1~2 分钟即可。
- 5、再用套好注射器的穿刺针从上述试管中准确吸取 2mL 下层抽提液加入另一试管中，加显色剂进行显色。
- 6、比色皿在用双蒸水冲洗干净后，还必须用无水乙醇冲洗，然后加三氯甲烷调零，否则加入的三氯甲烷中会混有水珠（三氯甲烷和水不互溶）。
- 7、操作工程中最好用玻璃管，某些材质的塑料离心管也可使用（用加入三氯甲烷的方法验证是否可用）。

以上七点为实验成败的关键。

#### 四、计算公式及举例：

##### 1、血清计算公式及举例：

###### ①、公式：

$$\text{液体样本中 NEFA 含量 (}\mu\text{mol/L)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$$

$C_{\text{标准}}$ ：标准品浓度，1000 $\mu\text{mol/L}$ 。

###### ②、计算举例：

取某人血清 0.2mL 按操作表进行游离脂肪酸测定。测得各管吸光度如下：空白管为 0.045，标准管为 0.311，测定管为 0.159。则计算如下：

$$\text{血清中 NEFA 含量 (}\mu\text{mol/L)} = \frac{0.159 - 0.045}{0.311 - 0.045} \times 1000 = 428.6\mu\text{mol/L}$$

##### 2、组织样本计算公式及举例：

###### ①、公式：

$$\text{组织样本中 NEFA 含量 (}\mu\text{mol/gprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

$C_{\text{标准}}$ ：标准品浓度，1000 $\mu\text{mol/L}$ ；

$C_{\text{pr}}$ ：组织样本蛋白浓度，gprot/L（prot 指蛋白）。

注：非蛋白样可以将样本质量浓度（样本质量（g）/匀浆液总体积（L））代替蛋白浓度代入计算。

###### ②、计算举例：

取大鼠 10%肝组织匀浆上清液 0.2mL 按操作表进行游离脂肪酸测定。测得各管吸光度如下：空白管为 0.045，标准管为 0.311，测定管为 0.293。10%肝组织中蛋白浓度为 12.24g/L，则计算结果如下：

$$\begin{aligned} \text{大鼠肝中 NEFA 含量 (}\mu\text{mol/gprot)} &= \frac{0.293 - 0.045}{0.311 - 0.045} \times 1000 \div 12.24 \\ &= 76.17 \mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

#### 五、注意点：

- 1、实验必须用分光光度计比色，不可用酶标仪、半自动及全自动生化分析仪比色（有机溶剂对这些仪器会有损坏）。
- 2、显色前吸取下层抽提液时，吸管不要触及管壁，以免沾染管壁上粘着的铜试剂。下层



ELK Biotechnology

Tel: +86-027-59760950 Website: [www.elkbiotech.cn](http://www.elkbiotech.cn)

抽提液必须清澈，否则会使结果偏高。

- 3、胆红素可被试剂一抽提而干扰比色，故黄疸血清须做一对照管，即最后不加显色剂而用正丁醇代替，在测定管光密度读数中减去此对照管的光密度读数。

## 附录：实验中可能出现的问题

在做游离脂肪酸的时候空白很高，也有的老师操作结果中标准和测定结果都很高，甚至能达到 3.000 以上，大多数情况下是由于操作问题引起的，下面是关于 NEFA 实验所要注意的几个问题：

- 1、在做组织样本的时候，不能将样本一起做成匀浆，因为组织在做成匀浆后，很多指标含量都会快速下降。一般应该是上午做好匀浆，下午就要测定完。样本太多一次不能操作完的，当天能做几个样本就做几个匀浆，最好是按分组取样，每组均要有样本参与，这样能减少批间差。
- 2、关于移液枪的使用，建议刚做实验的老师用倒退法加样，以减少误差。并且在实验前最好能够多加练习，如反复移蒸馏水，当加样熟练后，可进一步用无水乙醇和血清进行练习，这样可以提高加样的准确性。
- 3、在 NEFA 的混匀过程中，玻璃试管操作最好用橡皮塞塞住试管口后，按住试管上部混匀。切忌握住试管中部或者下部，因为这样会使混匀不充分，导致抽提不充分。
- 4、实验时所用器皿应当仔细洗刷并且烘干，如果有污染，则可能会对实验造成不必要的损失。例如：在配制铜试剂时，容器不干净，则可能导致配制出的铜试剂浑浊，而非澄清透亮。如果在实验过程中试管不干净，也可能引入杂蛋白，甚至造成空白管也能出现中间蛋白层的现象。
- 5、试剂配制时应按照说明书的顺序进行。例如：在铜试剂配制时，如果按照打乱顺序配制，即不按照甲、乙、丙的顺序，那么也有可能使配制好的铜试剂出现浑浊现象，从而不能使用。
- 6、实验时的自备试剂不能有污染，特别是蒸馏水，很多实验失败都是因为最容易忽略的蒸馏水受到了污染，引入杂离子或者杂蛋白。
- 7、离心后的上层铜试剂建议客户用移液器吸出。在吸下层抽提液时，应该用适当大小的穿刺针，如果穿刺针过大，例如用牛的穿刺针，有可能携带过多的上层铜试剂或者中间的蛋白层，如果吸到上层的铜试剂，在比色中会使吸光度特别高，引起结果偏差很大，并且做不同实验时所用的穿刺针不应交叉使用，最好每个实验所用的玻璃移液管或者穿刺针能够固定不变。（穿刺针即硬膜外麻醉针）
- 8、在比色过程中，应保证分光光度计使用恰当无误。比方说有的老师在调零时，只用一个比色皿调零，另一个比色皿没有冲洗和调零就直接使用，会造成初始值就偏高的现象，因为比色皿会吸附颜色。
- 9、在配制试剂过程中，最好能够严格按照我们说明书上的量进行准确量取，以加强实验的准确性，不能随便倒取。