

ARBEIDSBESKRIVELSE

Institutt for husdyr – og akvakulturvitenskap, UMB

Metodenavn: Non-esterified fatty acids (NEFA)
IHA-nr.: ARB-1169NEFA

1. Innledning

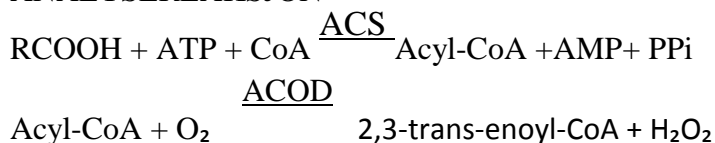
Dette er en ACS-ACOD enzymatisk fargemetode for å bestemme frie fettsyrer i plasma og serum. Reagenset fåes kjøpt i kit fra Wako. Det kan bestilles fra Houm. Metoden er nøyaktig, enkel og rask.

2. Analyseprinsipp.

U-estererte fettsyrer (NEFA) omsettes under prøven gjennom acyl-CoA syntetase (ACS) til acyl-CoA, AMP og fosforsyre (PPi) under medvirkning av koenzym A (CoA) og adenosin-5-trifosfat-dinatriumsalt (ATP). Det oppstår acyl-CoA noe som omvandles til 2,3-trans-enoyl-CoA og vannstoffperoksid under innvirkning av acyl-CoA-oksidasen (ACOD). Med peroksidase (POD), blir det dannet et blåfiolett fargekompleks under innvirkning av 3-metyl-N-etyl-N-(β-hydroksyetyl)-anilin (MEHA) og 4-aminoantipyrin (4-AA) gjennom oksidativ kopling.

Ved å måle absorpsjonen av den blåfiolette fargen kan NEFA-konsentrasjonen bestemmes.

ANALYSEREAKSJON



5. Utstyr

Mikropipette: 50ul
Plastrør 5ml
Automatpipetter: 1.0, 2.0, 10.0 og 20.0ml
Vannbad
Wirlmixer
Engangskyvetter
Spektrofotometer

6. Reagenser, kontroll og standard

Det brukes to reagenser som kjøpes i kit fra Houm.
NEFA HR(2)434-91795 fra Wako. Kitet rekker til 50 tester. Må lagres i kjøleskap.
Standard NEFA 270-77000 kjøpes fra samme sted.
Kontroll er plasma fra ku som vi har tappet selv og oppbevart i -80°C fryser. Prøvene må stå kortest mulig på benken ellers vil NEFA verdien øke.
Til inkubering brukes vannbad med 37°C.

7. Arbeidsbeskrivelse

Løs opp reagens R1a med 50ml buffer R1 og reagens R2a med 25ml buffer R2. Snu forsiktig på flaskene og la de stå ca 15min. Reagens R1 er holdbare i 10 dager ved 2-10

IHA/UMB						MSP
Utarbeidet av IJJ Jannbr	Godkjent H. Tingstad	Gjelder fra 02.09.04	Revisjon 16.02.10	Erstatter 02.09.04	Dokumentnavn: arb1169.DOC	Side 1-2

°C.(Kjøleskap)Reagens R2 er holdbare i 3uker ved 2-10°C

Prøver, standarer, kontroll og blank pipeteres som på skjemaet under, og leses av ved 550nm.

Tilsett:	Blank	Standard	Kontroll	Prøve
Prøve	50ul destillert vann	50ul standard	50ul kontroll	Plasma
Farge reagens R1	2,0ml	2,0ml	2,0ml	2,0ml
Mixes godt og sett til inkubering i 37°C i 10min				
Farge reagens R2	1,0ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml
Mix godt og sett til inkubering i 37°C i 10min.				

Ta prøvene ut av vannbadet og la de stå ved romtemperatur i 5min. til avkjøling.Les av på spektrofotometeret

Beregning:

$$\frac{(A \text{ prøve} - A \text{ blank}) * C \text{ standard}}{A \text{ standard}} = C \text{ prøve}$$

Hvor A =absorbansen ved 550nm
C= NEFA konsentrasjonen

Linieritet opp til 2mmol/l. Ved høyere konsentrasjon må prøvene fortynnes med destillert vann til 25 % av orginal konsentrasjonen.(1 del plasma + 3deler vann) og prøven må reanalyseres.

IHA/UMB						MSP
Utarbeidet av IJJ Jannbr	Godkjent H. Tingstad	Gjelder fra 02.09.04	Revisjon 16.02.10	Erstatter 02.09.04	Dokumentnavn: arb1169.DOC	Side 2-2