

游离脂肪酸 (FFA) 含量试剂盒 (测血清、动物组织、微生物、细胞)

微量法 100 管/96 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

游离脂肪酸，也称为非酯化脂肪酸，在与白蛋白结合的血浆中循环。动物血液中的游离脂肪酸 (FFA) 含量是一项重要的生理生化指标。血清中游离脂肪酸的浓度与脂类代谢、糖代谢、内分泌功能有关，游离脂肪酸的浓度会因为糖尿病、重症肝障碍、甲状腺功能亢进等疾病而上升。

测定原理：

用有机溶剂萃取 FFA。含有 FFA 的有机液与三乙醇胺铜反应,在有机相中形成脂肪酸铜 (铜皂) $\text{FFA} - \text{Cu}$ 。Cu 离子与显色液反应形成紫红色络合物。反应形成的颜色深浅与 Cu 离子浓度的关系符合朗伯-比耳定律，因此可利用此反应进行比色。

自备的仪器和用品：

酶标仪、离心机、可调式移液器、96 孔板、蒸馏水。

试剂的组成和配制：

萃取液：液体 120 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 15 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 15 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，室温保存；

试剂四：液体 12 mL×1 瓶，4℃ 保存；

样本前处理：

1. 动物组织：按照动物组织质量 (g)：萃取液 (mL) 为 1：5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 萃取液)，进行冰浴匀浆。震荡提取 15min，5000 rpm 4℃ 离心 5min，取有机相待测。

2. 血清：吸取 50 μL 血清样本，加入 1 mL 萃取液，震荡提取 15 min 后，4℃，5000 rpm 离心 5 min，取有机相待测。

3. 微生物、细胞：按照细胞数量 (10^4 个)：萃取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1 mL 萃取液) 加入萃取液，冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w，超声 2 秒，间隔 3 秒，总时间 3min)；震荡提取 15 min，然后 5000 rpm 4℃ 离心 5min，取有机相待测。

注意：有机相待测液可能存在于上层，也可能存在于下层，注意观察，体积较多的那一层即为有机相待测液。

测定步骤：

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 550 nm。

2、工作液的配制：临用前根据用量按照试剂一 (V)：试剂二 (V)：试剂三 (m) = 1 (mL)：1 (mL)：0.66 (g) 的比例充分混匀。(注意：现用现配，用多少配多少，在空瓶中配制，试剂盒中带有 4 个空瓶，先将试剂一与试剂二混合，最后再加入试剂三粉剂)

3、测定管：吸取600 μL样本，加入200 μL工作液，盖紧后震荡20 min，4℃，5000 rpm离心5 min，分层后取200 μL上层有机相，加入100 μL试剂四，摇匀，10 min后测定550 nm的吸光值，记为A测定。

4、空白管：吸取600 μL萃取液，加入200 μL工作液，盖紧后震荡20 min，4℃，5000 rpm离心5 min，分层后取200 μL上层有机相，加入100 μL试剂四，摇匀，10 min后测定550 nm的吸光值，记为A空白。

空白管只需测一次。ΔA=A测定-A空白

注意：1、有机溶剂易挥发，加入96孔板后应尽快检测。

2、测定管中加入的样本即样本前处理中的有机相待测液。

FFA 含量计算：

标准曲线： $y = 0.0161x - 0.0141$ $R^2 = 0.9985$ x：棕榈酸标准品浓度（nmol/mL）

y：吸光值差值ΔA

1、血清 FFA 含量计算：

$$\begin{aligned} \text{FFA 含量}(\mu\text{ mol/mL}) &= (\Delta A + 0.0141) \div 0.0161 \times V1 \div (V3 \times V1 \div V2) \div 1000 \\ &= 1.242 \times (\Delta A + 0.0141) \end{aligned}$$

2、动物组织、微生物、细胞中 FFA 含量计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{FFA 含量}(\mu\text{ mol/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0141) \div 0.0161 \times V1 \div (W \times V1 \div V2) \div 1000 \\ &= 0.062 \times (\Delta A + 0.0141) \div W \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{FFA 含量}(\mu\text{ mo/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0141) \div 0.0161 \times V1 \div (V1 \times Cpr) \div 1000 \\ &= 0.062 \times (\Delta A + 0.0141) \div Cpr \end{aligned}$$

V1：加入样本体积，0.6mL；V2：萃取液体积，1mL；V3：加入血清（浆）体积，0.05 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：动物组织样品质量，g；1000：1 μmol=1000 nmol。

注意事项：

1. 蛋白含量不可直接用萃取液提取的有机相待测液直接测定，可用蒸馏水或缓冲液或生理盐水选用本公司的 BCA 法蛋白含量测定试剂盒。
2. 最低检出限为 20 nmol/mL。