

游离脂肪酸（FFA）含量试剂盒（测血清、动物组织、微生物、细胞）**分光光度法 50 管/48 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-比尔定律,因此可利用此反应进行比色。

自备的仪器和用品：

可见分光光度计、离心机、可调式移液器、玻璃比色皿、蒸馏水。

试剂的组成和配制：

萃取液：液体 60 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 8 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 8 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，室温保存；

试剂四：液体 18 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、分光光度计预热 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750 μL 样本，加入250 μL 工作液，盖紧后震荡20 min，4℃，5000 rpm离心5 min，分层后取600 μL 上层有机相，加入300 μL 试剂四，摇匀，10 min后于玻璃比色皿中测定550 nm的吸光值，记为A测定。
- 4、空白管：吸取750 μL 萃取液，加入250 μL 工作液，盖紧后震荡20 min，4℃，5000 rpm离心5 min，分层后取600 μL 上层有机相，加入300 μL 试剂四，摇匀，10 min后于玻璃比色皿中测定550 nm的吸光值，记为A测定。空白管只需测一次。

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，加入比色皿后应尽快检测。

- 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: $y = 0.0322x - 0.0141$ $R^2 = 0.9985$ 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:

$$\text{FFA 含量}(\mu\text{mol/mL}) = (\Delta A + 0.0141) \div 0.0322 \times V1 \div (V3 \times V1 \div V2) \div 1000$$

$$= 0.621 \times (\Delta A + 0.0141)$$

2、动物组织、微生物、细胞中 FFA 含量计算:
(1) 按样本质量计算

$$\text{FFA 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0141) \div 0.0322 \times V1 \div (W \times V1 \div V2) \div 1000$$

$$= 0.031 \times (\Delta A + 0.0141) \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{FFA 含量}(\mu\text{mol/mg prot}) = (\Delta A + 0.0141) \div 0.0322 \times V1 \div (V1 \times Cpr) \div 1000$$

$$= 0.031 \times (\Delta A + 0.0141) \div Cpr$$

V1: 加入样本体积, 0.75 mL; 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 10 nmol/mL。