

## 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu$ L样本，加入200  $\mu$ L工作液，盖紧后震荡20 min，4 $^{\circ}$ C，5000 rpm离心5 min，分层后取200  $\mu$ L上层有机相，加入100  $\mu$ L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  $\mu$ L萃取液，加入200  $\mu$ L工作液，盖紧后震荡20 min，4 $^{\circ}$ C，5000 rpm离心5 min，分层后取200  $\mu$ L上层有机相，加入100  $\mu$ L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。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$

**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 $\Delta A$

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

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

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  $\mu$ mol=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。