

**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

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<sup>4</sup>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600μL样本，加入200μL工作液，盖紧后震荡20 min，4℃，5000 rpm离心5 min，分层后取200μL上层有机相，加入100μL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600μL萃取液，加入200μL工作液，盖紧后震荡20 min，4℃，5000 rpm离心5 min，分层后取200μL上层有机相，加入100μL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：

$$\begin{aligned} \text{FFA含量}(\mu\text{mol/mL}) &= (\Delta A + 0.0141) \div 0.0161 \times V_1 \div (V_3 \times V_1 \div V_2) \div 1000 \\ &= 1.242 \times (\Delta A + 0.0141) \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} \text{FFA含量}(\mu\text{mol/g鲜重}) &= (\Delta A + 0.0141) \div 0.0161 \times V_1 \div (W \times V_1 \div V_2) \div 1000 \\ &= 0.062 \times (\Delta A + 0.0141) \div W \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{FFA含量}(\mu\text{mol/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0141) \div 0.0161 \times V_1 \div (V_1 \times C_{pr}) \div 1000 \\ &= 0.062 \times (\Delta A + 0.0141) \div C_{pr} \end{aligned}$$

$V_1$ ：加入样本体积，0.6mL； $V_2$ ：萃取液体积，1mL； $V_3$ ：加入血清（浆）体积，0.05 mL； $C_{pr}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL； $W$ ：动物组织样品质量，g；1000：1  $\mu\text{mol}$ =1000 nmol。

**注意事项：**

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。

最低检出限为20 nmol/mL。