

## 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） $\text{FFA} - \text{Cu} \cdot \text{Cu}$  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  $\text{Cu}$  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  $\mu\text{L}$  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、 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。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$

**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 $\Delta A$

1、血清 FFA 含量计算：

$$\begin{aligned} \text{FFA 含量}(\mu\text{mol/mL}) &= (\Delta A + 0.0141) \div 0.0322 \times V1 \div (V3 \times V1 \div V2) \div 1000 \\ &= 0.621 \times (\Delta A + 0.0141) \end{aligned}$$

2、动物组织、微生物、细胞中 FFA 含量计算：

(1) 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{FFA 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0141) \div 0.0322 \times V1 \div (W \times V1 \div V2) \div 1000 \\ &= 0.031 \times (\Delta A + 0.0141) \div W \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{FFA 含量}(\mu\text{mol/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0141) \div 0.0322 \times V1 \div (V1 \times Cpr) \div 1000 \\ &= 0.031 \times (\Delta A + 0.0141) \div Cpr \end{aligned}$$

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。