

游离脂肪酸 (FFA) 含量检测试剂盒 (分光光度计法)
(本试剂盒仅供科研使用)**产品包装**

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0166	游离脂肪酸 (FFA) 含量检测试剂盒	50 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 60mL × 1 瓶	4℃, 避光
试剂一	液体 6mL × 1 瓶	4℃, 避光
试剂二	液体 6mL × 1 瓶	4℃
试剂三	粉剂 × 1 瓶	室温
试剂四	粉剂 × 2 瓶: 临用前取 1 瓶加入 23mL 无水乙醇, 充分溶解。未用完的试剂 2-8℃ 可以保存 2 周。溶解后溶液应为浅黄色, 若颜色变为橙红色则失效。	4℃, 避光
标准品	1 瓶: 取 3.9mL 萃取液加入瓶中, 充分溶解后得到 10μmol/mL 的棕榈酸标准溶液, 用于绘制标准曲线。	室温, 避光
空瓶	8mL × 4 个	室温

注: 萃取液的配制: 临用前根据拟用萃取液体积 (样本数 × 1mL), 按照三氯甲烷: 正庚烷: 甲醇=30:30:1.2 的比例充分混合, 现配现用, 在玻璃瓶或烧杯中配制。

一、产品说明

游离脂肪酸 (Free Fatty Acid, FFA), 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。

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) FFA-Cu。铜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铜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。

二、自备材料

可见分光光度计、离心机、可调式移液枪、玻璃比色皿 (**需使用可耐受有机溶剂材质的**)、正庚烷、无水甲醇、氯仿 (三氯甲烷)、无水乙醇和蒸馏水。

三、样品制备

1、组织: 用生理盐水冲洗干净后, 用吸水纸吸取表面水分, 按照组织质量 (g): 提取液 (mL) 为 1:5 的比例 (建议称取约 0.1g, 加入 1.0 mL 提取液), 冰浴匀浆后, 震荡提取 15min, 5000rpm, 4℃ 离心 5min, 取上清液待测。

2、血清或血浆: 吸取 50μL 血清样本, 加入 1mL 提取液, 震荡提取 15min, 5000rpm, 4℃ 离心 5min, 取上清液待测。

3、细胞: 按照细胞数量 (10^4 个) : 提取液体积 (mL) 为 500-1000:1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液) 加入提取液, 冰浴超声破碎 (功率 300w, 超声 2s, 间隔 3s, 总时间 3min), 震荡提取 15min, 5000rpm, 4°C 离心 5min, 取上清液待测。

四、操作步骤

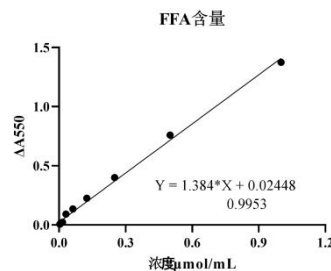
正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长到 550 nm, 无水乙醇调零。
- 2、工作液的配制: 临用前根据用量按照试剂一: 试剂二: 试剂三 = 1mL: 1mL: 0.66g 的比例充分混匀。此溶液为饱和溶液, 如还有粉剂未溶解, 取上清使用即可。
- 3、按下表操作:

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	标准管	空白管
待测液		50		
蒸馏水	50			
标准液			50	
萃取液	500	500	500	550
工作液	200	200	200	200
盖紧后, 常温振荡 20min 后, 5000rpm, 离心 5min。				
上层有机相	200	200	200	200
试剂四	800	800	800	800
充分混匀, 10min 后于玻璃比色皿中测定 550nm 的吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。 对照管、标准管和空白管只需测 1-2 次。				

五、FFA 含量的计算

1、标准曲线: $y = 1.384x + 0.02448$, $R^2 = 0.9953$, 其中 x 为 FFA 浓度 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$), y 为吸光值差值 ΔA 。



2、按照样本蛋白浓度计算:

$$\text{FFA 含量 } (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.02448) \div 1.384 \times V_{\text{样总}} \div (V_{\text{样总}} \times C_{\text{pr}}) \\ = (\Delta A - 0.02448) \div (1.384 \times C_{\text{pr}})$$

3、按照样本鲜重计算:

$$\text{FFA } (\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A - 0.02448) \div 1.384 \times V_{\text{样总}} \div W = (\Delta A - 0.02448) \div (1.384 \times W)$$

4、按照细胞数量计算:

$$\text{FFA 含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - 0.02448) \div 1.384 \times V_{\text{样总}} \div N = (\Delta A - 0.02448) \div (1.384 \times N)$$

5、按照血清体积计算:

$$\text{FFA 含量 } (\mu\text{mol}/\text{L}) = (\Delta A - 0.02448) \div 1.384 \times 1000 = 722.54 \times (\Delta A - 0.02448)$$

1000: 换算单位, 1L=1000mL; V 样总: 制样时加入提取液体积, 1 mL;
 Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 动物组织样品质量, g; N: 细菌或细胞数量, 以 10^4 计。

六、注意事项

- 1、有机溶剂易挥发, 尽量在 30min 内完成测量, 并且测完后要密封好再丢弃。
- 2、必须保证每管的震荡频率及时间一致。
- 3、因所用试剂多数为有机溶剂, 同一支吸头多次吸取会造成体积不准确, 建议更换吸头
- 4、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。
- 5、本法中, 游离脂肪酸的低检出限为 20nmol/mL, ΔA 的范围为 0.025~1.5, 若小于 0.025, 可增加样本质量; 若大于 1.5, 需对样本进行稀释, 最终计算结果需乘以稀释倍数。
- 6、提供的标准曲线及公式仅供参考, 若有需要, 可用提供的标准品自制标曲 (计算公式及线性范围根据自制标准曲线需作对应修改), 但需要注意, 受仪器及个人操作影响, 客户自制标准曲线可能与说明书中提供的标准曲线有差别。若无另外的实验要求, 也可直接使用说明书所给标曲进行计算。

七、实验案例

下列不同样本取相应质量或体积, 加入 1mL 提取液, 按照步骤进行检测, 并计算 FFA 含量:

样本	质量/体积	A 对照	A 测定			ΔA	FFA 含量
鸡血清	-	0.259	0.407	0.399	0.387	0.139	82.504 $\mu\text{mol/L}$
牛肝	0.1564g	0.259	0.419	0.385	0.404	0.144	0.551 $\mu\text{mol/g}$
大肠杆菌	4×10^{10}	0.259	0.559	0.515	0.503	0.267	$4.375 \times 10^{-8} \mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}$

八、常见问题及解决方案

问题	可能原因	解决方法
样品读数重复性差	样品类型不合适	参考说明书了解不兼容的样品类型
	组织样品匀浆不充分	延长超声时间/增加匀浆器的研磨次数
	样品反复冻融次数过多	将样品分装, 不可反复冻融
	样品中含有干扰物质	排查干扰物质, 必要时对样品进行脱蛋白处理
	样品读数超出线性范围	对样品进行浓缩或稀释, 使读数处于线性范围内
	孔中有气泡	气泡会干扰读数, 操作时尽量避免产生气泡, 读数前务必去除气泡
样品和标准品读数偏低/偏高	样品放置时间过长或储存不当	使用新鲜制备的样品, 按推荐温度保存至使用前
	试剂盒组分未完全解冻	待组分完全解冻后轻轻混匀再使用
	试剂在冰上放置时间过长	每次使用前新鲜配制反应混合液
	孵育时间/温度不当	参考说明书推荐的孵育时间和/或温度
	试剂加样量错误	检查移液枪是否校准 (始终使用能吸取整体积的最小量程移液枪); 尽量避免吸取过小体积的试剂
	配制反应混合液时移液误差	始终配制混合母液