

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一比耳定律, 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 (10^4 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 μL 样本, 加入 200 μL 工作液, 盖紧后震荡 20 min, 4℃, 5000 rpm 离心 5 min, 分层后取 200 μL 上层有机相, 加入 100 μL 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 μL萃取液，加入200 μL工作液，盖紧后震荡20 min，4℃，5000 rpm离心5 min，分层后取200 μL上层有机相，加入100 μL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 ΔA

1、血清 FFA 含量计算：

$$\text{FFA 含量} (\mu\text{mol/mL}) = (\Delta A + 0.0141) \div 0.0161 \times V1 \div (V3 \times V1 \div V2) \div 1000$$
$$= 1.242 \times (\Delta A + 0.0141)$$

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

$$\text{FFA 含量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0141) \div 0.0161 \times V1 \div (W \times V1 \div V2) \div 1000$$
$$= 0.062 \times (\Delta A + 0.0141) \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

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

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 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 20 nmol/mL。