

组织及血液游离脂肪酸（FFA）含量检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHB6-M96	组织及血液游离脂肪酸（FFA）含量试剂盒	96T	微量法

产品说明:

FFA既是脂肪水解的产物，又是脂肪合成的底物。血清中FFA的浓度与脂类代谢、糖代谢、内分泌功能有关。

FFA与铜离子结合形成脂肪酸铜盐，并溶于氯仿；利用铜试剂法测定铜离子含量，即可推算出游离脂肪酸含量。

试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	自备试剂	-
试剂二A	液体20mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二B	粉剂×1瓶	2-8℃ 保存
试剂三	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存
标准品	粉剂×1支	常温保存

溶液的配制:

- 1、试剂一：实验前，取一个玻璃瓶，按照正庚烷：无水甲醇：氯仿=24:1:25 的比例配制（自备），盖紧后混匀，大概需要 50mL，2-8℃ 保存。使用后及时封口；
- 2、试剂二：将试剂二B 倒入试剂二A 中40℃加热震荡溶解20min，此溶液为饱和溶液，若还有粉剂未溶解，取上清使用即可，2-8℃可以保存3 个月；
- 3、试剂三：临用前取 1 瓶加入 13 mL 无水乙醇充分溶解，未用完的试剂2-8℃可以保存2 周；
- 4、标准品：临用前把试剂转移到 10 mL 玻璃瓶中，加入7.8 mL 氯仿充分溶解，即为5μmol/mL 的棕榈酸标准溶液，未用完的试剂2-8℃可以保存4 周。

操作步骤:

一、样本处理

1、血清中FFA测定：将所取血液，室温静置 1h 后，4℃，3500 rpm 离心 15min，取上层血清置于冰上保存，待测。

2、组织中FFA含量测定：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 体积(mL)为 1: 5~10 的比例（建议称取约0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000rpm，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

二、操作步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 550 nm，分光光度计无水乙醇调零。
2. 试剂二在 37℃ 水浴中预热 20 min 以上。
3. 标准品的稀释：将标准品用氯仿稀释成 1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05 μmol/mL。
4. 标准品稀释表

序号	稀释前浓度 (μmol/mL)	标准液体积 (μL)	氯仿体积 (μL)	稀释后浓度 (μmol/mL)
1	5	200	800	1
2	1	160	40	0.8
3	1	120	80	0.6
4	1	160	240	0.4
5	0.4	200	200	0.2
6	0.2	200	200	0.1
7	0.1	200	200	0.05

备注：实验中每个标准管需 30 μL 标准溶液。

5. 按下表在 1.5 mL 离心管中加入相应试剂

	对照管	测定管	空白管	标准管
蒸馏水 (μL)	30			
样本 (μL)		30		
氯仿 (μL)			30	
标准品 (μL)				30
试剂一 (μL)	300	300	300	300
试剂二 (μL)	120	120	120	120
充分振荡 15 min 后，3000 rpm，离心 10 min				
上层溶液 (μL)	50	50	50	50
试剂三 (μL)	200	200	200	200
充分振荡 5 min 后，静置 15 min，取 0.2 mL 于微量玻璃比色皿/96 孔板中，在 550 nm 下测吸光值，分别记为 A 对照管、A 测定管、A 空白管、A 标准管。 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （对照管、空白管和标准曲线只需做 1-2 次）				

二、FFA 含量计算

- 1、根据标准管的浓度 (x, μmol/mL) 和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ (y, $\Delta A_{\text{标准}}$)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ (y, $\Delta A_{\text{测定}}$) 带入公式计算样本浓度 (x, μmol/mL)。

- 2、血清 FFA 含量：

$$\text{FFA 含量 } (\mu\text{mol/L}) = 1000x$$

- 3、组织 FFA 含量：

- (1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{FFA 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = x \times V_{\text{样总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样总}}) = x \div C_{\text{pr}}$$

- (2) 按样本质量计算

$$\text{FFA 含量 } (\mu\text{mol/g 质量}) = x \times V_{\text{样总}} \div W$$

V 样总：上清液总体积，1 mL；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；1000：单位换算系数，1L=1000mL。

注意事项:

1. 试剂三配制应尽量晚配，可在操作到加入试剂二时，再配制试剂三。
2. 必须保证每管的震荡频率及时间一致。
3. 尽量在 30min 内完成测量。
4. 上层溶液不可以直接加入到 96 孔板内，并且测完后要密封好再丢弃。
5. 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