北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

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

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) FFA 一 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、**甲醇、三氯甲烷、正庚烷**

试剂的组成和配制：

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：

萃取液配制：临用前请根据拟用萃取液体积（样本数×1 m L）将三氯甲烷、正庚烷和甲醇按照 30（mL）:30(mL)：1.2（mL）的比例混合，现配现用，在玻璃瓶或烧杯中配制。

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 μ 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 μ L样本，加入250 μ L工作液，盖紧后震荡20 min，4℃，5000 rpm离心5 min，分层后取600 μ L上层有机相，加入300 μ L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750μL萃取液，加入250μL工作液，盖紧后震荡20 min，4℃，5000 rpm离心5 min，分层后取600μL上层有机相，加入300μL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。△A=A测定-A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△A

1、血清 FFA 含量计算：

FFA 含量(μmol/mL)=(△A+0.0141)÷0.0322×V1÷(V3×V1÷V2)÷1000

=0.621×(△A+0.0141)

2、动物组织、微生物、细胞中 FFA 含量计算：

（1）按样本质量计算

FFA 含量(μmol/g 鲜重)=(△A+0.0141)÷0.0322×V1÷（W× V1÷V2）÷1000

=0.031×(△A+0.0141)÷W

（2）按样本蛋白浓度计算

FFA 含量(μmol/mg prot)= (△A+0.0141)÷0.0322×V1÷(V1×Cpr)÷1000

=0.031×(△A+0.0141)÷Cpr

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。