

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) $\text{FFA} - \text{Cu}$ 。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:

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 mL)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 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、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 μ L萃取液，加入250 μ L工作液，盖紧后震荡20 min，4 $^{\circ}$ C，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。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 ΔA

1、血清 FFA 含量计算：

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

2、动物组织、微生物、细胞中 FFA 含量计算：

(1) 按样本质量计算

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

(2) 按样本蛋白浓度计算

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

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 μ mol=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。