

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0682

Size: 50T/48S

游离脂肪酸含量 (FFA) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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。

三、需自备的仪器和用品:

研钵、冰、台式离心机、可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、一个 40mL 玻璃瓶、一个 10 mL 玻璃瓶、正庚烷、无水甲醇、氯仿 (三氯甲烷) 无水乙醇和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 50 mL×1 瓶	室温保存	-
试剂一	自备	室温保存	实验前一天, 取一个玻璃瓶, 按照正庚烷: 无水甲醇: 氯仿=24:1:25 的比例配置 (自备) 盖紧后混匀
试剂二	液体 16 mL×1 瓶	室温保存	-
试剂三	粉剂×2 瓶	4℃保存	临用前每瓶加入 32mL 无水乙醇充分溶解, 4℃可保存一周
标准品	粉剂×1 支	室温保存	10mg 棕榈酸, 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 5 μmol/mL 的棕榈酸标准溶液。

五、操作步骤：

1、样品中 FFA 提取：

(1) 血清中 FFA 测定：将所取血液，室温静置 1 h 后，于 4 °C 离心机 3500 rpm 离心 15min，取上层血清置于 -20°C 冰箱保存，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，称取约 0.1g，加入 1.0 mL 提取液，匀浆后，8000rpm，4°C 离心 10min，取上清液，待测。

2、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) 试剂二在 37°C 水浴中预热 30 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 μ mol/mL。

按下表在 1.5mL 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）	50			
样本（μL）		50		
氯仿（μL）			50	
标准品（μL）				50
试剂一（μL）	500			
试剂二（μL）	200			
充分振荡 10min 后，3000rpm，离心 10min				
上层溶液（μL）	200			
试剂三（μL）	800			
充分振荡 2min 后，静置 15min，于 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。（对照管和空白管各只做一管）				

六、FFA 含量计算：

1. 标准曲线的绘制：

以标准溶液的浓度为 x 轴，以 ΔA 标准 ($\Delta A = A$ 标准管 - A 空白管) 为 y 轴，绘制标准曲线，得到方程 $y = kx + b$ 。将 ΔA ($\Delta A = A$ 测定管 - A 对照管) 带入方程得到 x 。

2. 血清中 FFA 含量计算

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

3. 组织中 FFA 含量计算

(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) 按样本鲜重计算

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

$V_{\text{样总}}$ ：上清液总体积，1 mL； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样品鲜重，g。1000：单位换算系数，1L=1000mL。

七、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，并且测完后要密封好再丢弃。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。