

游离脂肪酸FFA含量测定试剂盒

Free Fatty Acids Content Assay Kit

E1001

描述: 游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)通常指 10 碳以上的非酯化脂肪酸(nonesterified fatty acid, NFFA), 在血中与白蛋白结合形成简单的脂蛋白, 参与机体能量代谢, 也参与肥胖、高脂血症、糖尿病等病理进程, 是临床和基础研究常用的检测指标。非酯化脂肪酸也是农业轻工业等领域的经常性检测项目。脂肪酸测定有滴定法、比色法、原子分光光度法、高压液相层析法和酶法等。本试剂盒采用比色法, 经过优化能够检测**实体组织、细胞、血清中的游离脂肪酸含量**, 线性范围 **10-1000umol/L**。

原理: 游离或非酯化脂肪酸 NFFA 和 Cu^{2+} 特异反应, 形成立体笼状结构的脂肪酸-铜皂分子复合物, 与显色剂反应后生成紫红色络合物, 其光密度值与游离脂肪酸浓度成正比。

适用范围: 测定**各类动物组织、细胞、血清中的游离脂肪酸浓度**。

产品特点:

1. 试剂盒经过优化, 线性范围宽, 灵敏度高;
2. 适用样本范围广, 可测定各类动物组织、细胞、血清中的游离脂肪酸油含量;
3. 优化的提取方法, 效率高, 稳定性强;
4. 操作简单省时, 1h 内即可完成测定;
5. 无需特殊仪器, 常规操作即可。

组成:

组份	50 次	105 次	200 次	储存和效期
R1	2.5ml	5ml	10ml	2-8°C, 半年有效
R2	2.5ml	5ml	10ml	2-8°C 避光保存, 半年有效
沉淀剂	1.5g	3g	6g	2-8°C 保存, 半年有效
显色剂	3.5ml	7ml	14ml	2-8°C 避光密封保存, 半年有效
脂肪酸标准品 (10mM)	0.5ml	0.5ml	1ml	2-8°C, 半年有效

自备试剂: 正庚烷、无水甲醇、氯仿

萃取液 (自备): 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, 盖紧后混匀, 2-8°C 保存。推荐使用新鲜配制的萃取液进行实验操作。

所需设备: 酶标仪、721、722 型可见光分光光度计。最佳工作波长 550nm, 如无此波长建议优先选用 570nm、次选 530、490nm。

操作步骤:

一、提取液配制

计算样本所需的裂解液体积，按**正庚烷：无水甲醇：氯仿**=24:1:25 的比例混匀，2-8℃密封保存。

二、样本处理

1. 细胞样本：收集至少 2×10^6 个新鲜细胞，PBS 洗涤两次，800g 离心，弃上清，按每 10^6 个细胞加入 200ul 提取液的比例，冰浴超声破碎细胞（建议功率 300w，超声 2 秒，间隔 3 秒，总时间 3min）；室温（20-25℃）涡旋震荡 15min（**注意：震荡速度不低于 1000rpm**），5000rpm 4℃离心 5min，溶液分两层，上层水相包含细胞碎片，取 240ul 下层细胞裂解液待测（注意尽量不要吸取上层水相）；

2. 组织样本：差减法称重，取至少 50mg 组织样本，剪碎后 PBS 洗涤 1-2 次，按每 10mg 组织加入 100ul 提取液的比例，电动或手动匀浆破碎组织，涡旋震荡 15min（**注意：震荡速度不低于 1000rpm**），5000 rpm 4℃离心 5min，溶液分两层，上层水相包含组织碎片，取 240ul 下层组织裂解液待测（注意尽量不要吸取上层水相）；

3. 血清样本：取至少 20ul 血清，按每 10ul 加入 200ul 提取液的比例，涡旋震荡 15min（**注意：震荡速度不低于 1000rpm**），5000rpm 4℃离心 5min，溶液分两层，取 240ul 下层提取液待测（注意尽量不要吸取上层水相）。

三、标准品稀释

用提取液将 10 mmol/L 标准品**倍比稀释**为 1000、500、250、125、62.5、31.2、15.6、7.8umol/L，注意设置标准品 0 浓度管即空白管。（因试剂易挥发，请准确吸取，及时盖紧 EP 管盖，减少误差）

四、工作液配制

计算样本和标准品所需用量，按 R1 (ml): R2 (ml): 沉淀剂 (g) = 1: 1: 0.66 的比例混合均匀，2-8℃保存不超过 24h，**现用现配**。（**注意：先将 R1 与 R2 混合均匀，再加入沉淀剂，混匀溶解**）

五、显色液配制

计算样本和标准品所需用量，按无水甲醇：显色剂=9：1 的比例混匀，即为显色液 2-8℃保存不超过 24h，**现用现配**。

六、游离脂肪酸浓度测定

1. 按下表进行加样；

	空白管	标准品	样品
提取液 (ul)	240		
标准品 (ul)		240	
样品 (ul)			240
工作液 (ul)	80	80	80

2. 室温（20-25℃）涡旋振荡 10min，静置 5min；

3. 4℃、5000rpm 离心 5min，取 30ul 上清；



4. 加入显色剂 600ul 混匀, 盖紧盖子室温 (20-25°C) 静置 5min, 取 200ul 于酶标板中上机测定;
5. 测定时, 先用空白管调零, 然后测定各管 550nm OD 值;
6. 绘制标准曲线并计算浓度;

附 Excel 作图步骤: 各标准管 OD 值为 y 轴, 标准品浓度为 x 轴。(1)鼠标左键圈住数据, 点击做图向导, 选择-散点图-, 点击-完成-。(2)鼠标右键点图上的某一点, 点击-添加趋势线-, 点击-选项-, 点击-显示公式-和-R²值-。

7. 建议以样本质量、细胞数校正游离脂肪酸含量: 样本校正浓度=游离脂肪酸浓度/样本质量。

相关问题及解决方案:

Q1: 冻存样本可以测定 FFA 含量么?

A1: 尽量使用新鲜样本, -20°C 储存不超过 10 天。一般情况下血甘油三酯能水解脂肪酸, 即使 4°C 保存 FFA 也可升高 20%左右。

Q2: 反应体系可以调整么?

A2: 可以按照各组分加样比例, 微调体积, 由于试剂的特殊性, 调整比例不宜超过 20%。

Q3: 样本提取有哪些注意事项?

A3:

- 1) 提取液为有机试剂, 现用现配, 防止挥发;
- 2) 样本裂解过程中, 室温涡旋振荡速度不能低于 1000rpm, 时间不能低于 15min, 如果想缩短提取时间, 可提高震荡转速 2000-3000rpm, 震荡时间 10min;
- 3) 各样本裂解震荡时间和条件需一致, 减少误差。

Q4: 测定时加入显色剂注意事项?

A4: 显色剂易挥发, 与样本反应时切记盖紧管盖, 反应完毕后, 立即上机测定, 减小误差。

Q5: 样本较少, 可以同时测定 FFA、TC、TG 么?

A5: 测定 FFA 需要单独裂解, 测定 TC、TG 可以用普利莱 E1013、E1015 试剂盒。

相关产品	
E1002	液体样本甘油含量酶法测定试剂盒
E1003	液体样本甘油三酯 (TG) 含量酶法测定试剂盒
E1013	组织细胞甘油三酯 (TG) 含量酶法测定试剂盒
E1005	液体样本总胆固醇 (TC) 含量酶法测定试剂盒
E1015	组织细胞总胆固醇 (TC) 含量酶法测定试剂盒