

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
AYHB4-C48	组织及血液亚铁离子含量试剂盒	48T	常量法

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 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	自备试剂	-
试剂二A	液体 16 mL×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：临用前取一瓶加入32 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℃封口膜封口，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，待测。

二、测定步骤

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℃水浴中预热20min 以上。
3. 标准品的稀释：将标准品用氯仿稀释成0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025μmol/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 50μL 标准溶液。

5. 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	500	500	500
试剂二 (μL)	200	200	200	200
充分振荡15min后，3000rpm，离心10min				
上层溶液 (μL)	200	200	200	200
试剂三 (μL)	800	800	800	800
充分振荡5min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。 ΔA标准=A标准管-A空白管，ΔA测定=A测定管-A对照管（对照管、空白管和标准曲线只需做1-2次）。				

三、FFA 含量计算

- 1、根据标准管的浓度（x，μmol/mL）和吸光度ΔA标准（y，ΔA标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将ΔA测定（y，ΔA测定）带入公式计算样本浓度（x，μmol/mL）。
- 2、血清中FFA含量计算：

$$\text{FFA} \text{ (}\mu\text{mol/L)} = 1000x$$
- 3、组织中FFA含量计算：
 - （1）按样本蛋白浓度计算

$$\text{FFA含量} (\mu\text{mol/mg prot}) = x \times V_{\text{样总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样总}}) = x \div C_{\text{pr}} \text{ (}$$
 - 2) 按样本质量计算

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

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

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，并且测完后要密封好再丢弃。
4. 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。