

# 游离脂肪酸（FFA）含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10173

规格：100T/96S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 50 mL×1 瓶（自备）	常温保存
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×2 瓶	4°C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；
- 2、试剂三：临用前每瓶加入 13 mL 无水乙醇充分溶解，4°C可保存一周；
- 3、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 5 $\mu$ mol/mL 的棕榈酸标准溶液，4°C保存。

**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。

**技术指标：**检出限：0.0390  $\mu$ mol/mL线性范围：0.05-2  $\mu$ mol/mL

**注意：**实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

**需自备的仪器和用品：**

研钵/匀浆器、冰、台式离心机、可调式移液枪、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、一个 50mL 玻璃瓶、一个 10mL 玻璃瓶、正庚烷、无水甲醇、氯仿（三氯甲烷）、无水乙醇和蒸馏水。

**操作步骤：****一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

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 4°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 mL 提取液, 匀浆后, 8000rpm, 4°C离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

## 二、操作步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 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 $\mu\text{mol/mL}$ 。
4. 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 ( $\mu\text{L}$ )	30			
样本 ( $\mu\text{L}$ )		30		
氯仿 ( $\mu\text{L}$ )			30	
标准品 ( $\mu\text{L}$ )				30
试剂一 ( $\mu\text{L}$ )	300	300	300	300
试剂二 ( $\mu\text{L}$ )	120	120	120	120
充分振荡10min后, 3000rpm, 离心10min				
上层溶液 ( $\mu\text{L}$ )	50	50	50	50
试剂三 ( $\mu\text{L}$ )	200	200	200	200
充分振荡 2min 后, 静置 15min, 取 0.2mL 于微量玻璃比色皿/96 孔板中, 在 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 1-2 管)				

## 三、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 $\Delta A$ 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  $\Delta A$  ( $\Delta A = A$ 测定管 -  $A$ 对照管) 带入方程得到x。

2、血清FFA含量:

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

3、组织FFA含量:

(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) 按样本质量计算

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

$V_{\text{样总}}$ : 上清液总体积, 1 mL;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL;  $W$ : 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。
4. 上层溶液不可以直接加入到 96 孔板内, 并且测完后要密封好再丢弃。
5. 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。

### 实验实例:

- 1、取小鼠血清进行样本处理,按照测定步骤操作,使用96孔板测得A对照管=0.098、A测定管=0.308、 $\Delta A = A$ 测定管-A对照管=0.308-0.098=0.21,带入标准曲线 $y = 0.6679x + 0.019$ ,计算 $x = 0.286$ ,按血清含量计算:  
FFA含量( $\mu\text{mol/L}$ ) =  $1000x = 1000 \times 0.286 = 286 \mu\text{mol/L}$ 。

### 相关发表文献:

- [1] Shanming Ruan,Zhiqian Zhang, Xinxin Tian,et al. Compound Fuling Granule Suppresses Ovarian Cancer Development and Progression by disrupting mitochondrial function, galactose and fatty acid metabolism. Journal of Cancer. September 2018;(IF3.182)
- [2] Tunyu Jian,Yuexian Wu,Xiaoqin Ding,et al. A novel sesquiterpene glycoside from Loquat leaf alleviates oleic acid-induced steatosis and oxidative stress in HepG2 cells. Biomedicine & Pharmacotherapy. January 2018;(IF3.743)
- [3] Rui Wang,Junhua Yuan,Caishun Zhang,et al. Neuropeptide Y-Positive Neurons in the Dorsomedial Hypothalamus Are Involved in the Anorexic Effect of Angptl9. Frontiers in Immunology. December 2018;(IF3.72)
- [4] Yao L, Chen S, Li W. Fatostatin inhibits the development of endometrial carcinoma in endometrial carcinoma cells and a xenograft model by targeting lipid metabolism[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2020: 108327.

### 参考文献:

- [1] Laurell S, Tibbling G. Colorimetric micro-determination of free fatty acids in plasma[J]. Clinica chimica acta, 1967, 16(1): 57-62.
- [2] Itaya K. A more sensitive and stable colorimetric determination of free fatty acids in blood[J]. Journal of lipid Research, 1977, 18(5): 663-665.
- [3] Duncombe W G. The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma[J]. Clinica chimica acta, 1964, 9: 122-125.