

游离脂肪酸 (FFA) 含量检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-ZF001-48 分光法 48样)

有效期: 3个月

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。

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。

自备仪器和用品:

研钵、冰、台式离心机、可调式移液枪、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、一个25 mL玻璃瓶、两个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。

试剂组成和配制:

提取液: 液体50ml×1瓶, 4℃保存。

试剂一: 自备。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, 4℃保存。使用后及时封口;

试剂二: 液体20ml×1瓶, 4℃保存。

试剂三: 粉剂×2瓶, 4℃保存。临用前在试剂瓶中加入32 mL无水乙醇, 充分溶解。

标准品: 粉剂×1瓶, 4℃保存。临用前加入7.8 mL氯仿充分溶解, 即为5μmol/ml的棕榈酸标准溶液。

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、液体中FFA测定: 直接测定

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℃离心10min, 取上清液, 待测。

3、细菌、细胞FFA含量测定: 微生物、细胞: 按照细胞数量(10^4 个): 提取液体积(mL)为500~1000: 1的比例(建议500万细胞加入1 mL提取液)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)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. 试剂三在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、0.025 μmol/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
试剂二 (μL)	500	500	500	500
试剂三 (μL)	200	200	200	200
充分振荡15min后, 3000rpm, 离心10min				
上层溶液 (μL)	200	200	200	200
试剂四 (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。
 $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$, $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ (对照管、空白管和标准曲线只需做1-2次)。

三、FFA 含量计算

根据标准管的浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$) 和吸光度 $\Delta A_{标准}$ (y , $\Delta A_{标准}$), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 $\Delta A_{测定}$ (y , $\Delta A_{测定}$) 带入公式计算样本浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$)。

1、液体FFA含量:

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

2、组织FFA含量:

按样本蛋白浓度计算

$$\text{FFA含量} (\mu\text{mol/mg prot}) = x \div \text{Cpr}$$

按样本质量计算

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

3、细菌、细胞FFA含量

$$\text{FFA含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = x \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量}$$

$V_{\text{样总}}$: 上清液总体积, 1 mL; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g;

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。