

游离脂肪酸（free fatty acid, FFA）含量测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-ZF001 微板法 48 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

FFA 既是脂肪水解的产物，又是脂肪合成的底物。FFA 的浓度与脂类代谢、糖代谢、内分泌功能有关，也可反映食物贮藏中的品质变化。

在弱酸性条件下，FFA 与铜盐反应生成铜皂，在 715nm 处有特征吸收峰，在一定范围内游离脂肪酸含量与显色程度呈线性关系。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃避光保存
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、震荡仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：

组织先用液氮粉碎后，称取 0.2g 至（1.5-2mL）EP 管中，再加入 1mL 的提取液，于震荡仪上震荡提取 3h，8000rpm 室温离心 10min，取上清液待测。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000rpm 室温离心 10min，取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ 10^4 ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：

取澄清的液体 0.1mL，加 1mL 提取液，于震荡仪上震荡提取 3h，8000rpm 室温离心 10min，取上清液待测。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 715 nm。

② 先挑选 2 个样本做预测定，确定适合本批样本最适取样量。

③ 在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
上清液	400	400
试剂一	200	
试剂二		200

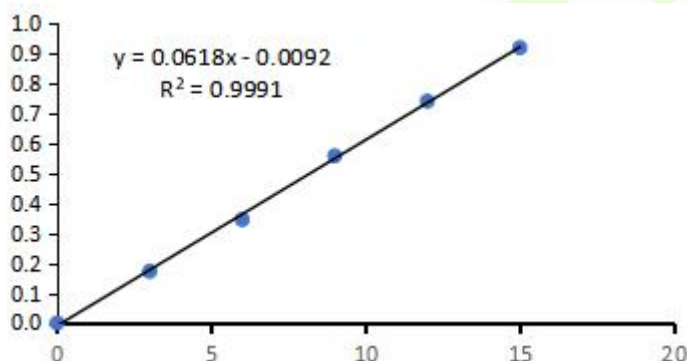
充分震荡 5min, 室温静置 5min, 取上层 200μL 于 96 孔板中, 于 715nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需做一个自身对照)。

【注】1. 若 ΔA 在零附近徘徊, 可增加样本取样量 (至 0.3g), 则改变后的样本质量 W 需代入计算公式重新计算。

2. 若 A 测定管大于 1, 则降低样本取样量 (至 0.1g), 或上清液用提取液稀释, 则稀释倍数 D 代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0618x - 0.0098$, x 是标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 是 ΔA 。



2、按样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{FFA}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0098) \div 0.0618 \times V_1] \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= 16.18 \times (\Delta A + 0.0098) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{FFA}(\mu\text{mol/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0098) \div 0.0618 \times V_1] \div (V_1 \div V \times \text{Cpr}) \times D \\ &= 16.18 \times (\Delta A + 0.0098) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{FFA}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0098) \div 0.0618 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 16.18 \times (\Delta A + 0.0098) \div 500 \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算:

$$\begin{aligned} \text{FFA}(\mu\text{mol/mL}) &= [(\Delta A + 0.0098) \div 0.0618 \times (V_2 + V)] \div V_2 \times D \\ &= 177.99 \times (\Delta A + 0.0098) \times D \end{aligned}$$

V---提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.4mL;

V2---加入液体体积, 0.1 mL;

W---样品质量, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。

Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒