Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd
Tel: 400-968-6088
Fax: 010-56371281
Http://www.solarbio.com

游离脂肪酸（FFA）含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC0595

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4℃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℃保存
试剂三	粉剂×2 瓶	4℃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℃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 5μmol/mL 的棕榈酸标准溶液，4℃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 μmol/mL

线性范围：0.05-2 μmol/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 ℃ 离心机 3500 rpm 离心 15min，取上层血清置于4℃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℃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℃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、0.05μmol/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（μL）	30			
样本（μL）		30		
氯仿（μL）			30	
标准品（μL）				30
试剂一（μL）	300	300	300	300
试剂二（μL）	120	120	120	120
充分振荡10min后，3000rpm，离心10min				
上层溶液（μL）	50	50	50	50
试剂三（μL）	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ΔA标准（ΔA=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ΔA（ΔA=A测定管-A对照管）带入方程得到x。

2、血清FFA含量：

FFA含量（μmol/L）=1000x

3、组织FFA含量：

(1) 按样本蛋白浓度计算

FFA含量（μmol/mg prot）=x×V样总÷（Cpr×V样总）=x÷Cpr

(2) 按样本质量计算

FFA含量（μmol/g 质量）=x×V样总÷W

V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；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、ΔA=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（μmol/L）=1000x=1000×0.286=286 μmol/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.

相关系列产品：

BC2340/BC2345　脂肪酶（LPS）活性检测试剂盒

BC1080/BC1085　乙醇脱氢酶（ADH）活性检测试剂盒