游离脂肪酸FFA含量测定试剂盒
Free Fatty Acids Content Assay Kit
货号：E1001

产品描述：游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)通常指 10 碳以上的非酯化脂肪酸(nonesterified fatty acid, NFFA)，在血中与白蛋白结合形成简单的脂蛋白，参与机体能量代谢，也参与肥胖、高脂血症、糖尿病等病理进程，是临床和基础研究常用的检测指标。非酯化脂肪酸也是农业轻工业等领域的经常性检测项目。脂肪酸测定有滴定法、比色法、原子分光光度法、高压液相层析法和酶法等。本试剂盒采用比色法，经过优化能够检测**实体组织、细胞、血清中**的游离脂肪酸含量，线性范围 **10-1000umol/L** 。

产品原理：游离或非酯化脂肪酸 NFFA 和 Cu^{2+}特异反应，形成立体笼状结构的脂肪酸-铜皂分子复合物，与显色剂反应后生成紫红色络合物，其光密度值与游离脂肪酸浓度成正比。

适用范围：测定**各类动物组织、细胞、血清**中的游离脂肪酸浓度。

产品特点：

1. 试剂盒经过优化，线性范围宽，灵敏度高；
2. 适用样本范围广，可测定各类动物组织、细胞、血清中的游离脂肪酸油含量；
3. 优化的提取方法，效率高，稳定性强；
4. 操作简单省时，1h 内即可完成测定；
5. 无需特殊仪器，常规操作即可。

产品组成：

组分	50 次	105 次	200 次	储存和效期
R1	2.5ml	5ml	10ml	2-8ºC 保存，一年有效
R2	2.5ml	5ml	10ml	2-8ºC 避光保存，一年有效
沉淀剂	1.5g	3g	6g	2-8ºC 保存，一年有效
显色剂	3.5ml	7ml	14ml	2-8ºC 避光密封保存，一年有效
脂肪酸标准品	1 支	1 支	2 支	2-8ºC 保存，一年有效

自备试剂：正庚烷、无水甲醇、氯仿

萃取液（自备）：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，盖紧后混匀，2-8ºC 保存。推荐使用新鲜配制的萃取液进行实验操作。

所需设备：酶标仪、721、722 型可见光分光光度计。最佳工作波长 550nm，如无此波长建议优先选用 570nm、次选 530、490nm。

操作步骤：

一、提取液配制

计算样本所需的裂解液体积，按**正庚烷：无水甲醇：氯仿**=24:1:25 的比例混匀，2-8ºC 密封保存。

二、样本处理

1. 细胞样本：收集至少 2×10^6 个新鲜细胞，PBS 洗涤两次，800g 离心，弃上清，按每 10^6 个细胞加入 200ul 提取液的比例，冰浴超声破碎细胞（建议功率 300w，超声 2 秒，间隔 3 秒，总时间 3min）；室温（20-25℃）涡旋震荡 15min（**注意：震荡速度不低于 1000rpm**），5000rpm 4℃离心 5min，溶液分两层，上层水相包含细胞碎片，取 240ul 下层细胞裂解液待测（注意尽量不要吸取上层水相）；
2. 组织样本：差减法称重，取至少 50mg 组织样本，剪碎后 PBS 洗涤 1-2 次，按每 10mg 组织加入 100ul

提取液的比例，电动或手动匀浆破碎组织，涡旋震荡 15min（**注意：震荡速度不低于 1000rpm**），5000 rpm 4°C离心 5min，溶液分两层，上层水相包含组织碎片，取 240ul 下层组织裂解液待测（注意尽量不要吸取上层水相）；

3. 血清样本：取至少 20ul 血清，按每 10ul 加入 200ul 提取液的比例，涡旋震荡 15min（**注意：震荡速度不低于 1000rpm**），5000rpm 4°C离心 5min，溶液分两层，取 240ul 下层提取液待测（注意尽量不要吸取上层水相）。

三、标准品稀释

取 1 支标准品，加入 0.5mL 提取液，溶解混匀即为 10mmol/L 标准品。

用**提取液**将 10 mmol/L 标准品**倍比稀释为** 1000、500 、250 、125 、62.5 、31.2 、15.6 、7.8umol/L，注意设置标准品 0 浓度管即空白管。**（因试剂易挥发，请准确吸取，及时盖紧 EP 管盖，减少误差）**

四、工作液配制

计算样本和标准品所需用量，按 R1（ml）：R2（ml）：沉淀剂（g）=1：1：0.66 的比例混合均匀，2-8°C 保存不超过 24h，**现用现配。（注意：先将 R1 与 R2 混合均匀，再加入沉淀剂，混匀溶解）**

五、显色液配制

计算样本和标准品所需用量，按无水甲醇：显色剂=9 ： 1 的比例混匀，即为显色液 2-8°C 保存不超过 24h，**现用现配。**

六、游离脂肪酸浓度测定

1. 按下表进行加样；

	空白管	标准品管	样品管
提取液（ul）	240		
标准品（ul）		240	
样品（ul）			240
工作液（ul）	80	80	80

2. 室温（20-25°C）涡旋振荡 10min，静置 5min；
3. 4°C、5000rpm 离心 5min，取 30ul 上清；
4. 加入显色剂 600ul 混匀，盖紧盖子室温（20-25°C）静置 5min，取 200ul 于酶标板中上机测定；
5. 测定时，先用空白管调零，然后测定各管 550nm OD 值；
6. 绘制标准曲线并计算浓度；

附 Excel 作图步骤：各标准管 OD 值为 *y* 轴，标准品浓度为 *x* 轴。(1)鼠标左键圈住数据，点击做图向导，选择-散点图-，点击-完成-。(2)鼠标右键点图上的某一点，点击-添加趋势线-，点击-选项-，点击-显示公式-和-R^2 值-。**（可扫描右侧二维码，下载标准曲线模版）**

7. 建议以样本质量、细胞数校正游离脂肪酸含量：样本矫正浓度=游离脂肪酸浓度/样本质量。

相关问题及解决方案：

Q1：冻存样本可以测定 FFA 含量么？

A1：尽量使用新鲜样本，－20°C 储存不超过 10 天。一般情况下血甘油三酯能水解脂肪酸，即使 4°C 保存

FFA 也可升高 20%左右。

Q2：反应体系可以调整么？

A2：可以按照各组分加样比例，微调体积，由于试剂的特殊性，调整比例不宜超过 20%。

Q3：样本提取有哪些注意事项？

A3：

1) 提取液为有机试剂，现用现配，防止挥发；

2) 样本裂解过程中，室温涡旋振荡速度不能低于 1000rpm，时间不能低于 15min，如果想缩短提取时间，可提高震荡转速 2000-3000rpm，震荡时间 10min；

3) 各样本裂解震荡时间和条件需一致，减少误差。

Q4：测定时加入显色剂注意事项？

A4：显色剂易挥发，与样本反应时切记盖紧管盖，反应完毕后，立即上机测定，减小误差。

Q5：样本较少，可以同时测定 FFA、TC、TG 么？

A5：测定FFA需要单独裂解，测定TC、TG可以用普利莱E1013、E1015试剂盒。

相关产品	
E1002	液体样本甘油含量酶法测定试剂盒
E1003	液体样本甘油三酯（TG）含量酶法测定试剂盒
E1013	组织细胞甘油三酯（TG）含量酶法测定试剂盒
E1005	液体样本总胆固醇（TC）含量酶法测定试剂盒
E1015	组织细胞总胆固醇（TC）含量酶法测定试剂盒