

## 细胞亚铁含量检测试剂盒48样说明书

规格：微量法 48样

检测波长：562nm

编号：JLC\_K14833

检测原理：亚铁嗉比色法

### 注意

- 1、正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定；
- 2、为了您的安全和健康，请佩戴好防护用具。

### 测定意义

是人体必须的微量元素之一，也是血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素及其他酶系统的主要成分，在氧的运输和脂肪氧化过程中起着重要作用，铁元素缺乏易造成贫血、代谢紊乱并影响机体免疫功能。

### 测定原理

$Fe^{2+}$  与亚铁嗉生成紫红色化合物，该有色物质在562nm处有特征吸收峰，进而计算得出亚铁含量。

### 需自备的仪器和用品

酶标仪、96孔板、可调式移液器、低温离心机、烘箱、震荡仪、冰、蒸馏水。

### 试剂清单

试剂名称	规格	数目	贮藏	备注
裂解液	液体25mL	x1	4°C	
试剂一	粉剂	x2	4°C,避光	
试剂二	液体20mL	x1	4°C	
试剂三	液体100mL	x2	4°C	
标准品(100X)	液体1mL	x1	4°C,避光	9mmol/L $Fe^{2+}$ 标准溶液

**样品提取 (按照步骤依次操作)****一、细胞样本**

- 1、先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；
- 2、取约 $1 \times 10^6$ 细胞加入0.2mL裂解液，混匀后放置在冰盒上裂解10min；
- 3、然后离心10min (12000rpm 4°C)，取上清，置冰上待测。

**注意**

- 1、建议样本处理后立刻用于检测，不建议放置超过2小时。

**实验准备**

- 1、酶标仪预热30min以上，调节波长至562nm；
- 2、试剂一的制备：管中加入1.6mL蒸馏水溶解备用；  
(用不完的试剂 4°C避光保存，建议2周内用完)  
(试剂一 为微量粉剂，开盖前甩下或离心 使粉剂落入底部后小心开盖)
- 3、标准品的配制：将标准品(100X)用试剂二稀释100倍(1:99)，避光放置，即为标准品(90  $\mu\text{mol/L Fe}^{2+}$ )，待用；  
(建议现用现配；也可根据自身实验需求调整标准品浓度)

**测定操作**

- 1、在96孔板中依次操作

试剂名称( $\mu\text{L}$ )	测定管	样本对照管(选做)	标准管(只做一管)	空白管(只做一管)
样本待测液	40	40	-	-
标准品	-	-	40	-
蒸馏水	-	-	-	40
试剂三	150	150	150	150
试剂一	20	-	20	20
蒸馏水	-	20	-	-

混匀，室温放置5min，于562nm 测定吸光值 $\Delta A_{\text{样}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$  或  $\Delta A_{\text{样}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$   
 $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$

**结果计算****(1)按照细胞/细菌数量计算**

$$\text{细胞亚铁含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \div (N \div V_{\text{提}} \times 1) \times D$$

$$= 18 \times (\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div N \times D$$

N: 细菌/细胞数量, 万个;

1:  $\mu\text{mol/L}$ 到 $\text{nmol/mL}$ 换算系数;

V提: 样本处理时提取液用量, 0.2mL;

## (2) 按照蛋白浓度计算

细胞亚铁含量( $\text{nmol/mg prot}$ ) =  $[(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \div (\text{Cpr} \times 1) \times D$

=  $90 \times (\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div \text{Cpr} \times D$

V样: 测定操作中样本待测液加样量, 0.04mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL

V标: 测定操作中标准品加样量, 0.04mL; 1:  $\mu\text{mol/L}$ 到 $\text{nmol/mL}$ 换算系数

C: 标准品浓度, 90  $\mu\text{mol/L}$ ;

D: 额外稀释倍数, 未稀释即为1;

### 附1: 标准曲线的绘制 (选做)

1、将标准品(100X)(9mmol/L) 使用试剂二稀释为200、120、70、35、10  $\mu\text{mol/L}$ 待测;

(标准品稀释操作可参考【附2】; 也可根据自身实验需求调整标准品浓度)

2、依据以下测定步骤操作, 根据结果绘制标准曲线

1)在96孔板中依次操作

试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )	标准管	空白管 (只做一管)
标准品	40	-
试剂二	-	40
试剂三	150	150
试剂一	20	20
混匀, 室温放置5min, 于562nm测定吸光值 $A_{\Delta A} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$		

3、以标准品浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) 为横坐标 (x), 以其对应的 $\Delta A$  ( $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ) 为纵

坐标 (y), 绘制拟合曲线, 即可得到线性方程 $y = kx + b$ ;

### 预实验的意义

#### 比色法检测试剂盒预实验非常重要

1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达处理的样本);

2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;

3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;

4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;

5、通过3 - 5组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。

**附2：标准曲线的标准品稀释操作表**

试剂名称 (μL)	标准品浓度(μmol/L)					
	900	200	120	70	35	10
标准品(9mmol/L)	50	-	-	-	-	-
标准品(900μmol/L)	-	300	-	-	-	-
标准品(200μmol/L)	-	-	240	140	70	20
试剂二	450	1050	160	260	330	380
(其中200、120、70、35、10 μmol/L 用于标准曲线的绘制)						