

细胞总铁含量检测试剂盒48样说明书

规格：微量法 50管/48样

编号：JLC_K14830

注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定。

测定意义

铁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

在酸性介质中铁从复合物中解离出来，再被还原剂还原成二价铁，并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，进而计算得出总铁含量。

自备仪器和用品

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、离心机、蒸馏水。

试剂清单

试剂名称	规格	数目	贮藏	
试剂一	液体15mL	x1	4°C	
试剂二	液体11.5mL	x1	4°C, 避光	
试剂三	粉剂	x1	4°C, 避光	
试剂四	液体2mL	x1	4°C, 避光	
标准品储备液	液体1mL	x1	4°C, 避光	1mmol/L铁标准溶液

样品提取 (按照步骤依次操作)

一、组织样本

- 1、先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；
- 2、取约 1×10^6 细胞加入0.2mL试剂一，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。

实验准备

- 1、酶标仪预热30min以上，设定温度25℃，设定波长到450nm。
- 2、试剂二的制备：加入20mL试剂一涡旋振荡，至全部溶解备用。
- 3、所有试剂孵育至室温。

测定步骤

- 1、酶标仪预热 30min以上，设定波长至562nm；
- 2、试剂三的制备[微量粉剂 使用前甩几下(或离心) 使粉体落入底部后 小心开盖。]：每支加入1.2mL蒸馏水溶解备用；
- 3、标准品的配制：将 标准品储备液 用 试剂四 稀释50倍，即为20μmol/L标准品；

试剂名称 (μL)	标准品 (500uL)
标准品储备液	10
试剂四	490
混匀，即为标准品	

- 4、所有试剂解冻至室温；

测定操作

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (只做一管)	标准管 (只做一管)
样本	40	-	-
蒸馏水	-	40	-
标准品	-	-	40
试剂二	150	150	150
试剂三	20	20	20
加入96孔板中，充分混匀，室温放置15min于562nm 测定吸光值A			

结果计算

(1)按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{细胞铁含量(nmol/10}^4\text{cell)} &= [(A_{\text{测定}}-A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}) \times C] \div (N \div V \times 1) \times D \\ &= 4 \times (\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div N \times D \end{aligned}$$

(2)按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{细胞铁含量(nmol/mg prot)} &= [(A_{\text{测定}}-A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}) \times C] \div (C_{\text{pr}} \times 1) \times D \\ &= 20 \times (\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

C标准：铁标品浓度，20μmol/L；

V：细胞处理时试剂一加入的量，0.2mL；

N: 加入细胞数量, 100 万 cell;

D: 额外稀释倍数, 未稀释即为1

1: umol/L到nmol/mL换算系数

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL

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。