

亚铁含量（亚铁嗉比色法）检测试剂盒说明书

（货号：ADS-W-QT027 微板法 96 样）

一、指标简介：

亚铁即二价铁可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。适用于检测组织、血清等样品中的亚铁含量。

二、试剂盒组分与配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 26mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 2 支	4°C保存	每支： 1. 临用前 8000g 4°C离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.2mL 的蒸馏水溶解备用（保存周期与试剂盒有效期相同）。
试剂三	液体 2mL×1 支	4°C保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4°C保存	每支： 1. 临用前取一支新的 EP 管，加入 10μl 标准品，再加入 490μl 试剂三，制成 2μg/mL 的亚铁标准品。 2. 禁止反复冻融（保存周期与试剂盒有效期相同）。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、天平、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（UV 板）、离心管、酶标仪、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：

取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 5min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

② 液体样本：澄清的液体可直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测。

③ 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）；12000rpm 4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液(mL)为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

- ①打开酶标仪, 设置温度 25°C (若仪器无法控温, 则等待仪器过自检程序即可), 调节波长到 562nm。
- ② 所有试剂解冻至室温, 按照下表在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
样本	120		
标准品		120	
蒸馏水			120
试剂一	260	260	260
试剂二	20	20	20

充分混匀, 置室温 15min 后, 若浑浊则需 3000rpm 离心 5min 后, 取 200μL 上清液至 96 孔板中, 于波长 562nm 处读取各管吸光度 A。

【注】: 1. 若 A 测定管大于 0.8, 可用蒸馏水对样本上清液进行稀释, 稀释倍数 D 代入计算公式。

2. 若 A 测定-A 空白的差值低于 0.01, 可增加样本上清液体积 V2 (如由 120μL 增至 200μL 或更多, 则试剂一相应减少), 标准管和空白管保持不变, 则改变后的 V2 则带入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按组织质量计算:

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量}(\mu\text{g/g}) &= (C \text{ 标准} \times V1) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (V2 \div V \times W) \times D \\ &= 2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量}(\text{nmol/g}) &= (C \text{ 标准} \times V1) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (V2 \div V \times W) \times 10^3 \div Mr \times D \\ &= 35.81 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量}(\mu\text{g/mg prot}) &= (C \text{ 标准} \times V1) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (V2 \div V \times Cpr) \times D \\ &= 2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量}(\text{nmol/mg prot}) &= (C \text{ 标准} \times V1) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (V2 \div V \times Cpr) \times 10^3 \div Mr \times D \\ &= 35.81 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

3、按照液体体积计算:

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量}(\mu\text{g/mL}) &= (C \text{ 标准} \times V1) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div V2 \times D \\ &= 2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量}(\mu\text{mol/L}) &= (C \text{ 标准} \times V1) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div V2 \times 10^3 \div Mr \times D \\ &= 35.81 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (C \text{ 标准} \times V1) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (V2 \div V \times \text{细胞数量}) \times D \\ &= 2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

$$\text{亚铁含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = (\text{C 标准} \times \text{V1}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{V2} \div \text{V} \times \text{细胞数量}) \times 10^3 \div \text{Mr} \times \text{D}$$
$$= 35.81 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{细胞数量} \times \text{D}$$

C 标准---亚铁标品浓度, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; V1---加入标准品体积, 0.12mL;

V2---加入样本体积, 0.12mL; V---提取液体积, 1mL;

W---样本取样质量, g; D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

Mr---亚铁分子量, 55.847; 细胞数量---若取 500 万则把 500 代入公式计算。

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。