

亚铁离子含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC5415

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
试剂一	液体 125mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 13 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

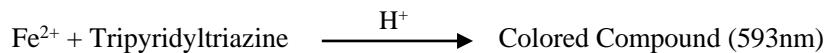
溶液的配制：

1. 标准品：10mg FeSO₄·7H₂O，临用前加入 900μL 蒸馏水和 20μL 浓硫酸，充分混匀，配制成 40 mmol/L 标准液，2-8℃可保存 2 周。

产品说明：

铁是人体必需的微量元素之一，对于维持机体正常生理功能具有重要作用。亚铁离子是血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素及其他酶系统的重要组成成分，帮助氧的运输，促进脂肪氧化。缺乏铁元素容易造成贫血、代谢紊乱，并影响机体的免疫功能。铁过量是引发或加剧多种慢性病（如糖尿病、心脑血管疾病、神经退化性疾病等）的危险因素。

Fe²⁺在酸性条件下与三吡啶基三嗪形成蓝色配合物，在593nm处有吸收峰，通过测定该波长吸光度即可计算 Fe²⁺的含量。



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：

可见分光光度计/酶标仪、天平、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、冰、蒸馏水和**浓硫酸**。

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. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。10000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌/细胞：按照细胞数量（10⁴ 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 200W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 5min）；然后 10000g，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清（浆）等液体样本：直接测定。若有浑浊请离心后取上清待测。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至593nm，分光光度计蒸馏水调零。

2. 标准溶液的稀释：取10 μ L 40 mmol/L标准液，加入990 μ L蒸馏水，混匀得到400 μ mol/L标准液，将400 μ mol/L标准液用试剂一进行稀释得到50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0.78125 μ mol/L的标准液，现配现用。

3. 标准溶液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 (μ mol/L)	标准液体积 (μ L)	试剂一体积 (μ L)	稀释后浓度 (μ mol/L)
1	400	125	875	50
2	50	500	500	25
3	25	500	500	12.5
4	12.5	500	500	6.25
5	6.25	500	500	3.125
6	3.125	500	500	1.5625
7	1.5625	500	500	0.78125

备注：实验中每个标准管需200 μ L标准液。

4. 在1.5mL离心管中按下表步骤加样：

试剂名称 (μ L)	测定管	标准管	空白管
样本	200	-	-
标准液	-	200	-
试剂一	-	-	200
试剂二	100	100	100
充分混匀，37 $^{\circ}$ C静置10min			
氯仿	100	-	-
充分涡旋震荡5min，之后12000g常温离心10min，小心吸取上层无机相200 μ L于微量玻璃比色皿/96孔板，测定593nm处吸光值，记为A测定，计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白}$ 。		于593nm处吸光值，记为A标准、A空白，计算 $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。空白管和标准曲线只需测1-2次。	

三、亚铁离子含量计算

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x， μ mol/L）和吸光度 $\Delta A_{标准}$ （y， $\Delta A_{标准}$ ），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{测定}$ （y， $\Delta A_{测定}$ ）带入公式计算样本浓度（x， μ mol/L）。

2. 亚铁离子含量的计算：

（1）按血清（浆）等液体体积计算：亚铁离子含量（ μ mol/L）=x

（2）按样本蛋白浓度计算：亚铁离子含量（ μ mol/mg prot）= $x \times 10^{-3} \times V_{提取} \div (C_{pr} \times V_{提取}) = 0.001x \div C_{pr}$

（3）按样本质量计算：亚铁离子含量（ μ mol/g 质量）= $x \times 10^{-3} \times V_{提取} \div W = 0.001x \div W$

（4）按细胞/细菌数量计算：亚铁离子含量（ μ mol/ 10^6 cell）= $x \times 10^{-3} \times V_{提取} \div N = 0.001x \div N$

Cpr: 蛋白质浓度，mg/mL；V提取：加入试剂一的体积，1mL；W：样本质量，g；N：细菌或细胞总数，以 10^6 计； 10^{-3} ：单位换算系数，1 μ mol/L= 10^{-3} μ mol/mL。

注意事项：

1. 用试剂一稀释得到的标准液容易失效，建议现用现配。

2. 如果 ΔA 测定过低或测定管吸光值接近空白管，可以增加样本量后再进行测定；如果 ΔA 测定大于0.4，建议将样本用试剂一适当稀释后再进行测定。注意同步修改计算公式。
3. 由于氯仿会腐蚀96孔板，所以在吸取上层无机相时需要注意不要吸到下层氯仿层。

实验实例：

1、取 0.1055g 小鼠肝脏组织，加入 1mL 试剂一，冰浴匀浆，离心后取上清按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.272-0.050=0.222，根据标准曲线 $y=0.0076x-0.0013$ ， $R^2=0.9993$ ，计算 $x=29.38\mu\text{mol/L}$ ，按样本质量计算：

亚铁离子含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $0.001x \div W = 0.278 \mu\text{mol/g}$ 质量。

2、取 200 μL 牛血清，按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.301-0.050=0.251，根据标准曲线 $y=0.0076x-0.0013$ ，计算 $x=33.20\mu\text{mol/L}$ ，按液体体积计算：

亚铁离子含量 ($\mu\text{mol/L}$) = $x=33.20 \mu\text{mol/L}$ 。

参考文献：

[1] Dong C, Yang M, Wang W. Study on spectrophotometric determination of Fe(II) and Fe(III) with 2, 4, 6-tri(2'-pyridyl)-1, 3, 5-triazine. [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2004, (01):76-78.

[2] Huang Y, Ma H, Xu J, et al. Development and Validation of Reference Methods for Determination of Serum iron. [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2011, 15(03):453-457.

[3] Wang H, Liu B, Ding Z, et al. Ferene method flow injection analysis as optimized in situ analysis of dissolved iron in marine waters. [J]. Marine Sciences, 2016, 40(05):82-87.

相关系列产品：

- BC1730/BC1735 血清铁浓度检测试剂盒
- BC2810/BC2815 血锌浓度检测试剂盒
- BC2860/BC2865 血清总铁结合能力 (TIBC) 检测试剂盒
- BC4350/BC4355 组织铁含量检测试剂盒

