

铁含量（亚铁嗉比色法） 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号：BP10143W

注意：请在试剂盒保质期内使用，具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用，不能用于临床诊断。

检测范围：0.1-10 $\mu\text{g/mL}$

灵敏度：0.1 $\mu\text{g/mL}$

有效期：6个月

保存温度：2-8 $^{\circ}\text{C}$

检测原理:

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，进而计算出铁含量。适用于检测组织、血清等样品的铁含量。

注意事项:

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

试剂盒组分：

试剂名称	规格（48T/46S）	规格（96T/94S）	保存条件
提取液	50mL×1 瓶	100mL×1 瓶	2-8℃
试剂一	13mL×1 瓶	26mL×1 瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃，避光
试剂三	2mL×1 瓶	4mL×1 瓶	2-8℃
试剂四	6mL×1 瓶	12mL×1 瓶	2-8℃
标准品	1mL×1 瓶	2mL×1 瓶	2-8℃，避光

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、恒温箱。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**, 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: $0.10-10 \mu\text{g/mL}$, 如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩, 样本的稀释液为提取液。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议做预实验验证其检测有效性
3. **组织样本**: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆, 然后 10000 g , 4°C 离心 5min, 取上清置冰上待测。
4. **细菌/细胞样本**: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 超声波破碎细菌或细胞 (功率 200w, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 10000 g , 离心 10min, 取上清待测。
5. **血清 (浆) 等液体样本**: 直接测定, 若浑浊, 则离心后取上清液检测。
6. 如果组织样本提取后仍然不清澈, 可在提取后样本上清加入试剂四沉淀, 样本上清和试剂四比例为 1:1, 混匀后离心取上清。但注意在计算结果乘 2, 此步骤相当于将样本稀释 2 倍。

检测前准备工作：

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. 2 $\mu\text{g/mL}$ 标准品的配制：标准品使用前用试剂三稀释 50 倍（即取 10 μL 的标准品至 EP 管中，再加 490 μL 的试剂三）制备成 2 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品。
3. 试剂二工作液配制：用前甩几下或离心使粉末落入底部，取一瓶加入 1.2mL 的蒸馏水溶解备用。

操作步骤：

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 562nm。
2. 样本测定（在 EP 管中依次加入）：

试剂名称(μL)	空白管	标准管	测定管	对照管（血清）
样本			120	120
标准品（2 $\mu\text{g/mL}$ ）		120		
蒸馏水	120			20
试剂一	260	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 200 μL 上清液加入 96 孔板中，在波长 562nm 处读取各管 OD 值。分别记为 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 。

注：

1. 血清样本如果离心后仍然不清澈或者有颜色需要设置样本对照管，对照管用蒸馏水代替试剂二，否则样本检测值过高，计算时测定管吸光值减去对照管吸光值。
2. 若 $A_{\text{测定管}}$ 大于 0.8，可用蒸馏水对样本上清液进行稀释，稀释倍数 N 代入计算公式。
3. 由于测血清样本时需要做对照组，本试剂盒 48T 只能测 24 个样，96T 测 50 个样。

实验结果结算：

1. 按照组织质量计算：

$$\begin{aligned} \text{铁含量} (\mu\text{g/g}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times W) \times N \\ &= 2 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times N \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{铁含量}(\text{nmol/g}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times W) \times 10^3 \\ &\div \text{Mr} \times N \\ &= 35.81 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times N \end{aligned}$$

2. 按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{铁含量} (\mu\text{g}/10^4 \text{cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times f) \\ &\times N \\ &= 2 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div f \times N \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{铁含量}(\text{nmol}/10^4 \text{cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times f) \\ &\times 10^3 \div \text{Mr} \times N \end{aligned}$$

$$=35.81 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div f \times N$$

3. 按照液体体积计算:

$$\text{铁含量} (\mu\text{g/mL}) = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times N$$

$$=2 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times N$$

$$\text{铁含量}(\text{nmol/L}) = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V) \times 10^3 \div Mr \times N$$

$$=35.81 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times N$$

4. 血清（加对照管样本）计算公式:

$$\text{铁含量}(\mu\text{g/mL}) = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times N$$

$$=2 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times N$$

$$\text{铁含量}(\mu\text{mol/L}) = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times 10^3 \div Mr \times N$$

$$=35.81 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times N$$

注:

$C_{\text{标准}}$: 铁标准品的浓度, $2 \mu\text{g/mL}$ V_1 : 加入样本体积, 0.12mL

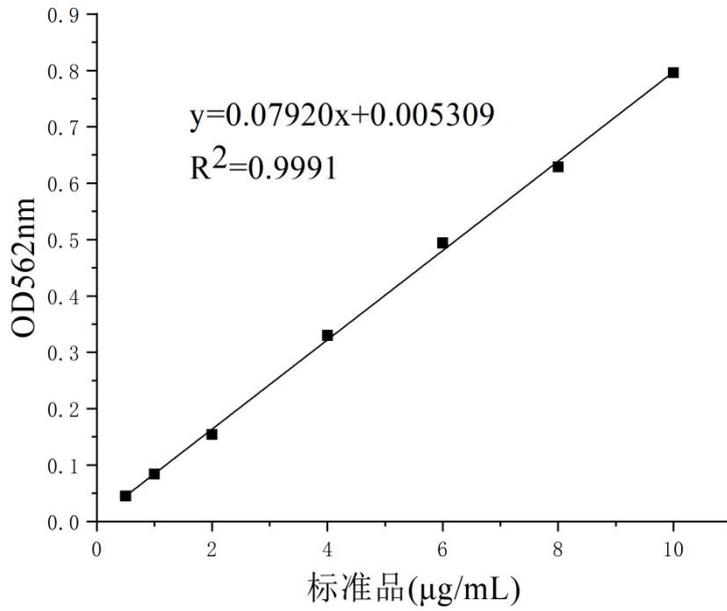
N : 样本稀释倍数 V : 提取液体积, 1mL

Mr : 铁分子量, 55.847 W : 样本质量, g

f : 细胞数量, 若取 500 万则把 500 代入公式计算

参考曲线:

$y=0.07920x+0.005309, R^2=0.9991$, x 是标准品的浓度 ($\mu\text{g/mL}$), y 是 ΔA 。



参考标曲：标准曲线可以不做，按前面操作后用计算公式计算即可。