

亚铁含量（亚铁嗉比色法）检测试剂盒说明书

（货号：BP10144W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

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℃保存	
试剂一	液体 26mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 2 支	4℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃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℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃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，以免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℃×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℃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℃（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：

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

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

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。