

亚铁含量(亚铁嗉比色法) 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号: BP10144W

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：

亚铁即二价铁可与亚铁嗪生成紫红色化合物，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。

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	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。

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: $5\sim 10$ 的比例 (例如称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆, 然后 10000 g , 4°C 离心 10min, 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 $500\sim 1000: 1$ 的比例 (建议按照每 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:** 澄清液体直接测定, 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三沉淀, 样本上清和试剂三比例为 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. 标准品的配制: 标准品使用前用蒸馏水稀释 50 倍 (即取 $10 \mu\text{L}$ 的标准品至 EP 管中, 再加 $490 \mu\text{L}$ 的蒸馏水) 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, 再加入 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 μg/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 3000 g 离心 5min 后, 取 200 μL 上清液加入 96 孔板中, 在波长 562nm 处读取吸光度 A。

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, 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 $A_{\text{测定}}$ 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) 若 $A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 的差值低于 0.01, 可增加样本上清体积 V_2 (如由 120 μL 增至 200 μL 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 V_2 代入公式重新计算。
- (4) 由于测血清样本时必须做对照组, 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：

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量} (\mu\text{g/g}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_2 \div V \times W) \times N \\ &= 2 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times N \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量}(\text{nmol/g}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_2 \div V \times W) \times \\ &10^3 \div \text{Mr} \times N \\ &= 35.81 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times N \end{aligned}$$

2. 按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量} (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_2 \div V \times f) \\ &\times N \\ &= 2 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div f \times N \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_2 \div V \times f) \\ &\times 10^3 \div \text{Mr} \times N \\ &= 35.81 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div f \times N \end{aligned}$$

3. 按照液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量} (\mu\text{g/mL}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_2 \times N \\ &= 2 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times N \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量}(\text{nmol/L}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_2 \times 10^3 \div \text{Mr} \times \\ &N \\ &= 35.81 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times N \end{aligned}$$

4. 血清（加对照管样本）计算公式：

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量}(\mu\text{g/mL}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_2 \times N \\ &= 2 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times N \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{亚铁含量}(\mu\text{mol/L}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_2 \times 10^3 \div Mr \times N \\ &= 35.81 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times N \end{aligned}$$

注:

$A_{\text{标准}}$: 标准孔 OD 值

$A_{\text{空白}}$: 空白孔 OD 值

$A_{\text{测定}}$: 测定孔 OD 值

$A_{\text{对照}}$: 对照孔 OD 值

$C_{\text{标准}}$: 亚铁标准品的浓度, $2 \mu\text{g/mL}$ V_1 : 加入标准品体积, 0.12mL

N : 样本稀释倍数

V : 提取液体积, 1mL

Mr : 亚铁分子量, 55.847

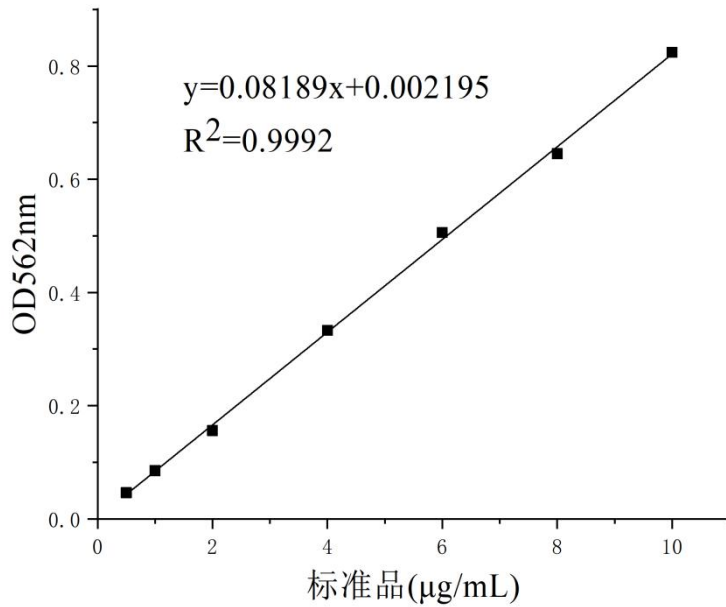
W : 样本质量, g

V_2 : 加入样本体积, 0.12mL

f : 细胞数量, 若取 500 万则把 500 代入公式计算

参考曲线:

$y=0.08189x+0.002195, R^2=0.9992$, 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。