

亚铁含量（亚铁嗉比色法）检测试剂盒说明书

（货号：PB1176W96 微量法 96 样）

有效期：3 个月

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验 样本和试剂浪费！

测定原理：

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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵和蒸馏水

试剂的组成和配制：

提取液：液体 100ml×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 30ml×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 3ml×1 瓶，4℃ 避光保存；

试剂三：液体 20ml×1 瓶，4℃ 保存；

标准品：液体 1ml×2 瓶，10 μg/ml 亚铁标准品溶液，4℃ 保存；

样本制备：

1、组织样本：0.1g 组织样本，加 1mL 的提取液研磨，粗提液全部转移到 EP 管中，12000rpm，离心 10min，上清液待测。

【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 的比例提取

2、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 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 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；于 4℃，12000g 离心 10min，取上清测定。

【注】：若增加样本量，可按细菌/细胞数量（10⁴个）：提取液（mL）为 1000~5000：1 的比例进行提取

3、液体样品：澄清的样本可以直接检测。若样本浑浊离心 10min，上清液待测。

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 562nm，蒸馏水调零。

2、亚铁标准曲线的制备：取 10 μg/ml 的亚铁标准液用试剂三稀释成不同浓度：0.5 μg/ml、1 μg/ml、2 μg/ml、4 μg/ml、6 μg/ml、8 μg/ml、10 μg/ml，进行标准曲线的制备。

浓度 μg/ml	亚铁标准液（μl）	试剂三（μl）
0.5 μg/ml	10	190
1 μg/ml	20	180
2 μg/ml	40	160
4 μg/ml	80	120
6 μg/ml	120	80

8 μ g/ml	160	40
10 μ g/ml	200	0

3、加样表：在 EP 管中依次加入

试剂 (μ L)	空白管	标准管	测定管
样本			120
标准品		120	
蒸馏水	120		
试剂一	260	260	260
试剂二	20	20	20
37℃反应 10min			
取 200 μ L 至微量石英比色皿/96 孔板中，若浑浊则需 3000rpm 离心 5min 后，取 200 μ L 上清液至 96 孔板中，于波长 562nm 处读取吸光度。分别记为 A 测定管，A 标准管，A 空白管，计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管； ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。			

亚铁含量计算：

1、标准曲线的绘制 以各标准溶液浓度为 x 轴，以其对应的吸光值 (ΔA 标准) 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中得到 x (μ g/ml)。

2、亚铁含量计算

(1) 按照样本蛋白浓度计算

亚铁含量 (μ g/mg prot) = $x \div C_{pr}$

亚铁含量 (nmol/mg prot) = $x \div C_{pr} \times 10^3 \div Mr$

(2) 按照样本质量计算

亚铁含量 (μ g/g 鲜重) = $x \times V_{\text{样总}} \div W$

亚铁含量 (nmol/g 鲜重) = $x \times V_{\text{样总}} \div W \times 10^3 \div Mr$

(3) 按照细胞数量计算

亚铁含量 (μ g/ 10^4 cell) = $x \times V_{\text{样总}} \div 500$

亚铁含量 (nmol/ 10^4 cell) = $x \times V_{\text{样总}} \div 500 \times 10^3 \div Mr$

(4) 按照液体体积计算

亚铁含量 (μ g/ml) = x

亚铁含量 (nmol/ml) = $x \times 10^3 \div Mr$

W: 样本质量, g; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL, 蛋白浓度需自行测定; $V_{\text{样总}}$: 加入的提取液体积, mL; 500: 细胞数量, 500 万; Mr: 亚铁分子量, 55.847

注意事项:

1. 溶血样本对检测有干扰，尽量避免采用溶血样本。
2. 玻璃器材需严格清洗，避免铁的污染，建议最好用一次性塑料试管。
3. 如果样品浓度过高，应用蒸馏水稀释后重测，结果乘以稀释倍数。