

## 细胞亚铁含量

规格：微量法 96 样

编号：ml300820

检测原理：亚铁嗉比色法

检测波长：562nm

### 注 意：

- 1、正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定；
- 2、为了您的安全和健康，请佩戴好防护用具；

### 测定意义：

铁是人体必须的微量元素之一，也是血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素及其他酶系统的主要成分，在氧的运输和脂肪氧化过程中起着重要作用，铁元素缺乏易造成贫血、代谢紊乱并影响机体免疫功能。

### 测定原理：

$\text{Fe}^{2+}$  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。

### 自备仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、低温离心机、烘箱、震荡仪、冰、蒸馏水

### 试剂清单：

| 试剂名称      | 规格       | 数目 | 贮藏    |                                  |
|-----------|----------|----|-------|----------------------------------|
| 裂解液       | 液体 25mL  | x1 | 4℃    |                                  |
| 试剂一       | 粉剂       | x2 | 4℃,避光 |                                  |
| 试剂二       | 液体 20mL  | x1 | 4℃    |                                  |
| 试剂三       | 液体 100mL | x2 | 4℃    |                                  |
| 标准品(100X) | 液体 1mL   | x1 | 4℃,避光 | 9mmol/L $\text{Fe}^{2+}$<br>标准溶液 |

**样本处理（按照步骤依次操作）：**

**一、细胞样本**

- 1、先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；
- 2、取约  $1 \times 10^6$  细胞加入 0.2mL 裂解液，混匀后放置在冰盒上裂解 10min；
- 3、然后离心 10min（12000rpm 4°C），取上清，置冰上待测。

**注意：**

- 1、建议样本处理后立刻用于检测，不建议放置超过 2 小时；

## 实验准备：

- 1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 562nm；
- 2、试剂一的制备：管中加入 1.6mL 蒸馏水溶解备用；  
(用不完的试剂 4℃ 避光保存，建议 2 周内用完)  
  
(试剂一 为微量粉剂，开盖前甩下或离心 使粉剂落入底部后小心开盖)
- 3、标准品的配制：将标准品(100X)用试剂二稀释 100 倍(1:99)，避光放置，即为标准品(90  $\mu\text{mol/L Fe}^{2+}$ )，待用；  
(建议现用现配；也可根据自身实验需求调整标准品浓度)

## 测定操作：

- 1、在 96 孔板中依次操作

| 试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )                                                                                                                                                                                 | 测定管 | 样本对照管<br>(*选做) | 标准管<br>(*只做一管) | 空白管<br>(*只做一管) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------|----------------|----------------|
| 样本待测液                                                                                                                                                                                                  | 40  | 40             | -              | -              |
| 标准品                                                                                                                                                                                                    | -   | -              | 40             | -              |
| 蒸馏水                                                                                                                                                                                                    | -   | -              | -              | 40             |
| 试剂三                                                                                                                                                                                                    | 150 | 150            | 150            | 150            |
| 试剂一                                                                                                                                                                                                    | 20  |                | 20             | 20             |
| 蒸馏水                                                                                                                                                                                                    | -   | 20             | -              | -              |
| 混匀，室温放置 5min，于 562nm 测定吸光值 A<br>$\Delta A_{\text{样}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 或 $\Delta A_{\text{样}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$<br>$\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ |     |                |                |                |

## 结果计算:

### (1) 按照细胞/细菌数量计算

$$\begin{aligned}\text{细胞亚铁含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \div (N \div V_{\text{提}} \times 1) \times D \\ &= 18 \times (\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div N \times D\end{aligned}$$

N: 细菌/细胞数量, 万个;

1:  $\mu\text{mol/L}$  到  $\text{nmol/mL}$  换算系数;

$V_{\text{提}}$ : 样本处理时提取液用量, 0.2mL;

### (2) 按照蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{细胞亚铁含量}(\text{nmol}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \div (C_{\text{pr}} \times 1) \times D \\ &= 90 \times (\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div C_{\text{pr}} \times D\end{aligned}$$

$V_{\text{样}}$ : 测定操作中样本待测液加样量, 0.04mL;       $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白质浓度,  $\text{mg/mL}$

$V_{\text{标}}$ : 测定操作中标准品加样量, 0.04mL;

1:  $\mu\text{mol/L}$  到  $\text{nmol/mL}$  换算系数

C: 标准品浓度, 90  $\mu\text{mol/L}$ ;

D: 额外稀释倍数, 未稀释即为 1;

## 附 1：标准曲线的绘制（选做）

- 1、将标准品(100X)(9mmol/L) 使用试剂二稀释为 200、120、70、35、10  $\mu\text{mol/L}$  待测；  
(标准品稀释操作可参考【附 2】；也可根据自身实验需求调整标准品浓度)
- 2、依据以下测定步骤操作，根据结果绘制标准曲线
  - 1) 在 96 孔板中依次操作

| 试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )                                                     | 标准管 | 空白管<br>(*只做一管) |
|----------------------------------------------------------------------------|-----|----------------|
| 标准品                                                                        | 40  | -              |
| 试剂二                                                                        | -   | 40             |
| 试剂三                                                                        | 150 | 150            |
| 试剂一                                                                        | 20  | 20             |
| 混匀，室温放置 5min，于 562nm 测定吸光值 A<br>$\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ |     |                |

- 3、以标准品浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) 为横坐标 (x)，以其对应的  $\Delta A$  ( $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ) 为纵坐标 (y)，绘制拟合曲线，即可得到线性方程  $y=kx+b$ ；

### 预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。

附 2：标准曲线的标准品稀释操作表

| 试剂名称 (μL)      | 标准品浓度(μmol/L) |      |     |     |     |     |
|----------------|---------------|------|-----|-----|-----|-----|
|                | 900           | 200  | 120 | 70  | 35  | 10  |
| 标准品(9mmol/L)   | 50            | -    | -   | -   | -   | -   |
| 标准品(900μmol/L) | -             | 300  | -   | -   | -   | -   |
| 标准品(200μmol/L) | -             | -    | 240 | 140 | 70  | 20  |
| 试剂二            | 450           | 1050 | 160 | 260 | 330 | 380 |

(其中 200、120、70、35、10 μmol/L 用于标准曲线的绘制)