

亚铁含量

规格：微量法 48 样/96 样

编号：FI-W48-N(1720)

检测原理：亚铁嗉比色法

检测波长：562nm

线性范围：10-400 $\mu\text{mol/L}$ (以 40 μL 待测液浓度)

检出限：5 $\mu\text{mol/L}$ (以 40 μL 待测液浓度)

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：

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	
提取液	液体 100mL	x1	4°C	
试剂一	粉剂	x1	4°C,避光	
试剂二	液体 10mL	x1	4°C	
标准品(100X)	液体 1mL	x1	4°C,避光	9mmol/L Fe^{2+} 标准溶液

样本处理（按照步骤依次操作）：

一、组织样本

- 1、按照质量(g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例加入提取液，冰浴匀浆；
(样本取样量记为 W，提取液用量记为 V_提)
(建议先尝试 0.2g：1mL 的比例；样本含量较低的可增加样本量；样本量较少时可等比例减少样本与提取液用量)
- 2、然后 12,000rpm 4℃ 离心 5min，取上清，置冰上待测（记为样本待测液）。

二、细菌/细胞样本

- 1、按照细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例加入提取液，冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；
(样本取样量记为 N (万个)，提取液用量记为 V_提)
(建议先尝试 500 万：1mL 的比例；样本含量较低的可增加样本量；样本量较少时可等比例减少样本与提取液用量)
- 2、然后 12,000rpm 4℃ 离心 5min，取上清，置冰上待测（记为样本待测液）。

三、液体样本

澄清样本可直接检测，若浑浊则离心取上清检测；

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 450nm；
- 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 (μL)	测定管	样本对照管 (*选做)	标准管 (*只做一管)	空白管 (*只做一管)
样本待测液	40	40	-	-
标准品	-	-	40	-
蒸馏水	-	-	-	40
提取液	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 $\Delta A_{\text{样}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 或 $\Delta A_{\text{样}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$				

注意：

- 1、有色样本待测液，可以做样本对照管 以消除样本本底值；
- 2、若测定管加入试剂后因样本原因产生浑浊，则应扩大体系后改为在 EP 管中操作，反应结束后离心取上清测定，参考【附 3】；
- 3、若 $\Delta A_{\text{样}} > 1.5$ 则超出试剂盒线性范围，建议将样本待测液用提取液稀释后测定，稀释倍数 (D) 代入公式计算；或直接减少样本加样量 ($V_{\text{样}}$)，并相应补充提取液（如由 40 μL 减少为 10 μL 样本+180 μL 提取液，其他试剂不变；对照管等同；标准管、空白管不变）；

参考下表：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本待测液	10	10	-	-
标准品	-	-	40	-
蒸馏水	-	-	-	40
提取液	180	180	150	150
试剂一	20		20	20
蒸馏水	-	20	-	-

(改变的数据代入公式重新计算: $V_{\text{样}}=0.01\text{mL}$)

- 4、若 $\Delta A_{\text{样}} < 0.02$ ，建议尝试增加样本取样量 (W 或 N) 测定；或减少提取时的提取液用量 ($V_{\text{提}}$) 以提高样本待测液浓度；或适当增加样本加样量 ($V_{\text{样}}$)，并相应减少提取液（如由 40 μL 增加为 80 μL 样本+110 μL 提取液，其他试剂不变；对照管等同；标准管、空白管不变）；

参考下表：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本待测液	80	80	-	-
标准品	-	-	40	-
蒸馏水	-	-	-	40
提取液	110	110	150	150
试剂一	20		20	20
蒸馏水	-	20	-	-

(改变的数据代入公式重新计算: $V_{\text{样}}=0.08\text{mL}$)

结果计算:

(1) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{亚铁含量}(\mu\text{mol/g}) &= [(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \div (W \div V_{\text{提}} \times 10^3) \times D \\ &= 0.09 \times (\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div W \times D\end{aligned}$$

W: 样本质量, g;

10^3 : mL 到 L 换算系数;

$V_{\text{提}}$: 样本处理时提取液用量, 1mL;

(2) 按照细胞/细菌数量计算

$$\begin{aligned}\text{亚铁含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \div (N \div V_{\text{提}} \times 10^3) \times D \\ &= 0.09 \times (\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div N \times D\end{aligned}$$

N: 细菌/细胞数量, 万个;

10^3 : mL 到 L 换算系数;

$V_{\text{提}}$: 样本处理时提取液用量, 1mL;

(3) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{亚铁含量}(\mu\text{mol/L}) &= [(\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{标}}) \times C] \times D \\ &= 90 \times (\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times D\end{aligned}$$

$V_{\text{样}}$: 测定操作中样本待测液加样量, 0.04mL;

$V_{\text{标}}$: 测定操作中标准品加样量, 0.04mL;

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 (μL)	标准管	空白管 (*只做一管)
标准品	40	-
试剂二	-	40
提取液	150	150
试剂一	20	20
混匀，室温放置 5min，于 562nm 测定吸光值 A $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$		

- 3、以标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$) 为横坐标 (x)，以其对应的 ΔA ($\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$) 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)

附 3：反应浑浊的样本检测方案

1、在 EP 管中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管	样本对照管 (*选做)	标准管 (*只做一管)	空白管 (*只做一管)
样本待测液	60	60	-	-
标准品	-	-	60	-
蒸馏水	-	-	-	60
提取液	225	225	225	225
试剂一	30		30	30
蒸馏水	-	30	-	-
混匀，室温放置 5min，然后 3000rpm 室温 离心 5min 取 200μL 上清液，于 562nm 测定吸光值 A $\Delta A_{\text{样}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 或 $\Delta A_{\text{样}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$				

(改变的数据代入公式重新计算: $V_{\text{样}}=0.06\text{mL}$, $V_{\text{标}}=0.06\text{mL}$)