

亚铁离子含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC5410

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

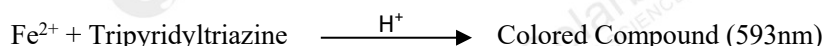
溶液的配制：

1. 标准品：10mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，临用前加入 900 μL 蒸馏水和 20 μL 浓硫酸，充分混匀，配制成 40 mmol/L (40000 $\mu\text{mol/L}$) 标准品，2-8℃可保存 2 周。

产品说明：

铁是人体必需的微量元素之一，对于维持机体正常生理功能具有重要作用。亚铁离子是血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素及其他酶系统的重要组成成分，帮助氧的运输，促进脂肪氧化。缺乏铁元素容易造成贫血、代谢紊乱，并影响机体的免疫功能。铁过量是引发或加剧多种慢性病（如糖尿病、心脑血管疾病、神经退化性疾病等）的危险因素。

样本中的 Fe^{2+} 在酸性条件下与三吡啶基三嗪形成蓝色配合物，在593nm处有吸收峰，通过测定该波长吸光度即可计算 Fe^{2+} 的含量。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、天平、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、涡旋振荡仪、冰、蒸馏水、浓硫酸(>95%，AR)和氯仿(>98%，AR)。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆。10000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌/细胞：按照细菌/细胞数量(10^7 个)：提取液体积(mL)为 1~5：1 的比例（建议 10^7 个细菌/细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细菌/细胞（功率 200W，超声 5 秒，间隔 5 秒，总时间 5min）；然后 10000g，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清（浆）等液体样本：直接测定。若有浑浊请离心后取上清待测。





二、测定步骤

1. 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至593nm，蒸馏水调零。
2. 标准品的稀释：将40 mmol/L（40000μmol/L）标准品用蒸馏水进行稀释得到100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0.78125μmol/L的标准品，现配现用。
3. 标准品稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度（μmol/L）	标准品体积（μL）	蒸馏水体积（μL）	稀释后浓度（μmol/L）
1	40000	10	990	400
2	400	500	1500	100
3	100	1000	1000	50
4	50	1000	1000	25
5	25	1000	1000	12.5
6	12.5	1000	1000	6.25
7	6.25	1000	1000	3.125
8	3.125	1000	1000	1.5625
9	1.5625	1000	1000	0.78125

备注：下述实验中每个标准管需800μL标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

4. 在1.5mL离心管中按下表步骤加样：

试剂名称（μL）	测定管	标准管	空白管
样本	800	-	-
标准品	-	800	-
蒸馏水	-	-	800
试剂一	400	400	400
充分混匀，37℃静置10min			
氯仿	200	-	-
充分涡旋震荡5min，之后12000g常温离心10min，小心吸取上层无机相800μL于1mL玻璃比色皿，测定593nm处吸光值，记为A测定，计算ΔA测定=A测定-A空白。		于593nm处测定吸光值，记为A标准、A空白，计算ΔA标准= A标准-A空白。空白管和标准曲线只需测1-2次。	

备注：细胞/细菌样本或者其他无色匀浆液无需加氯仿处理，37℃反应完成后直接测定即可。

三、亚铁离子含量计算

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x，μmol/L）和吸光度ΔA标准（y，ΔA标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将ΔA测定（y，ΔA测定）带入公式计算样本浓度（x，μmol/L）。

2. 亚铁离子含量的计算：

- （1）按血清（浆）等液体体积计算：亚铁离子含量（μmol/L）=x
- （2）按样本蛋白浓度计算：亚铁离子含量（μmol/mg prot）=x×10⁻³×V提取÷（Cpr×V提取）=0.001x÷Cpr
- （3）按样本质量计算：亚铁离子含量（μmol/g 质量）=x×10⁻³×V提取÷W=0.001x÷W
- （4）按细胞/细菌数量计算：亚铁离子含量（μmol/10⁷ cell）=x×10⁻³×V提取÷N=0.001x÷N



V提取：加入提取液的体积，1mL；Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌或细胞总数，以10⁷计；10³：单位换算系数，1μmol/L=10⁻³μmol/mL。

注意事项：

1. 如果ΔA测定过低或测定管吸光值接近空白管，可以增加样本量后再进行测定；如果ΔA测定大于1.5，建议将样本用提取液适当稀释后再进行测定。注意同步修改计算公式。

实验实例：

- 1、取 0.1g 小鼠肝脏样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，离心后取上清按照测定步骤操作，使用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.359-0.008=0.351，根据标准曲线 $y=0.0148x+0.0022$ ， $R^2=0.9993$ ，计算 $x=23.57$ ，按样本质量计算：

亚铁离子含量 (μmol/g 质量) = $0.001x \div W = 0.236 \mu\text{mol/g 质量}$ 。

- 2、取 1.25×10^7 个 HeLa 细胞，按照测定步骤操作，使用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.064-0.000=0.064，根据标准曲线 $y=0.0148x+0.0022$ ， $R^2=0.9993$ ，计算 $x=4.18 \mu\text{mol/L}$ ，按细胞数量计算：

亚铁离子含量 (μmol/10⁷ cell) = $x \times 10^{-3} \div N = 0.001x \div N = 0.00334 \mu\text{mol/L}$ 。

相关发表文献：

- [1] He X, Zhu Y, Yang L, Wang Z, Wang Z, Feng J, Wen X, Cheng L, Zhu R. MgFe-LDH Nanoparticles: A Promising Leukemia Inhibitory Factor Replacement for Self-Renewal and Pluripotency Maintenance in Cultured Mouse Embryonic Stem Cells. *Adv Sci (Weinh)*. 2021 Feb 25;8(9):2003535. doi: 10.1002/advs.202003535. PMID: 33977050; PMCID: PMC8097378.
- [2] Yang X, Chen Y, Guo J, Li J, Zhang P, Yang H, Rong K, Zhou T, Fu J, Zhao J. Polydopamine Nanoparticles Targeting Ferroptosis Mitigate Intervertebral Disc Degeneration Via Reactive Oxygen Species Depletion, Iron Ions Chelation, and GPX4 Ubiquitination Suppression. *Adv Sci (Weinh)*. 2023 May;10(13):e2207216. doi: 10.1002/advs.202207216. Epub 2023 Mar 23. PMID: 36951540; PMCID: PMC10161035.
- [3] Gong Y, Liu Z, Zhang Y, Zhang J, Zheng Y, Wu Z. AGER1 deficiency-triggered ferroptosis drives fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis with type 2 diabetes mellitus. *Cell Death Discov*. 2023 Jun 6;9(1):178. doi: 10.1038/s41420-023-01477-z. PMID: 37280194; PMCID: PMC10244405.
- [4] Meng YT, Zhou Y, Han PY, Ren HB. Ferroptosis inhibition attenuates inflammatory response in mice with acute hypertriglyceridemic pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2023 Apr 21;29(15):2294-2309. doi: 10.3748/wjg.v29.i15.2294. PMID: 37124891; PMCID: PMC10134424.
- [5] Jiang P, Zhai Z, Zhao L, Zhang K, Duan L. α-Lipoic acid alleviates dextran sulfate sodium salt-induced ulcerative colitis via modulating the Keap1-Nrf2 signaling pathway and inhibiting ferroptosis. *J Sci Food Agric*. 2024 Feb;104(3):1679-1690. doi: 10.1002/jsfa.13053. Epub 2023 Nov 15. PMID: 37850313.
- [6] Song J, Wang H, Sheng J, Zhang W, Lei J, Gan W, Cai F, Yang Y. Vitexin attenuates chronic kidney disease by inhibiting renal tubular epithelial cell ferroptosis via NRF2 activation. *Mol Med*. 2023 Oct 27;29(1):147. doi: 10.1186/s10020-023-00735-1. PMID: 37891461; PMCID: PMC10612207.

参考文献：





- [1] Dong C, Yang M, Wang W. Study on spectrophotometric determination of Fe(II) and Fe(III) with 2, 4, 6- tri(2'-pyridyl)-1, 3, 5-triazine. [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2004, (01):76-78.
- [2] Huang Y, Ma H, Xu J, et al. Development and Validation of Reference Methods for Determination of Serum iron. [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2011, 15(03):453-457.
- [3] Wang H, Liu B, Ding Z, et al. Ferene method flow injection analysis as optimized in situ analysis of dissolved iron in marine waters. [J]. Marine Sciences, 2016, 40(05):82-87.

相关系列产品:

- BC1730/BC1735 血清铁浓度检测试剂盒
- BC2810/BC2815 血锌浓度检测试剂盒
- BC2860/BC2865 血清总铁结合能力 (TIBC) 检测试剂盒
- BC4350/BC4355 组织铁含量检测试剂盒

