

亚铁离子含量检测试剂盒说明书

微量法

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：BC5415

规格：100T/96S

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 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 13 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

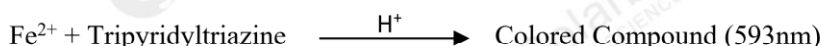
溶液的配制：

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。

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/酶标仪、天平、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、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 2×10^7 个细菌/细胞加入 1mL 提取液（或者 10^7 个细菌/细胞加入 0.5mL 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/酶标仪预热30min以上，调节波长至593nm，分光光度计蒸馏水调零。
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	200	600	100
3	100	500	500	50
4	50	500	500	25
5	25	500	500	12.5
6	12.5	500	500	6.25
7	6.25	500	500	3.125
8	3.125	500	500	1.5625
9	1.5625	500	500	0.78125

备注：下述实验中每个标准管需200μL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	200	-	-
标准品	-	200	-
蒸馏水	-	-	200
试剂一	100	100	100
充分混匀，37℃静置10min			
氯仿	100	-	-
充分涡旋震荡5min，之后12000g常温离心10min，小心吸取上层无机相200μL于微量玻璃比色皿/96孔板，测定593nm处吸光值，记为A测定，计算ΔA测定=A测定-A空白。		吸取200μL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) = $x \times 10^{-3} \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) = 0.001x \div C_{\text{pr}}$

(3) 按样本质量计算：亚铁离子含量 (μmol/g 质量) = $x \times 10^{-3} \times V_{\text{提取}} \div W = 0.001x \div W$



(4) 按细胞/细菌数量计算: 亚铁离子含量($\mu\text{mol}/10^7 \text{ cell}$)= $x \times 10^{-3} \times V_{\text{提取}} \div N = 0.001x \div N$

Cpr: 蛋白质浓度, mg/mL ; $V_{\text{提取}}$: 加入提取液的体积, 1mL ; W: 样本质量, g ; N: 细菌或细胞总数, 以 10^7 计; 10^{-3} : 单位换算系数, $1\mu\text{mol/L} = 10^{-3}\mu\text{mol/mL}$ 。

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, 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。
2. 由于氯仿会腐蚀96孔板, 所以在吸取上层无机相时需要注意不要吸到下层氯仿相。

实验实例:

- 1、取 0.1g 小鼠肝脏组织, 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 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.228 - 0.047 = 0.181$, 根据标准曲线 $y = 0.0092x - 0.0006$, $R^2 = 1$, 计算 $x = 19.74\mu\text{mol/L}$, 按样本质量计算:
亚铁离子含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) $= 0.001x \div W = 0.197\mu\text{mol/g}$ 质量。
- 2、取 2.49×10^7 个 HeLa 细胞加入 1mL 提取液超声, 按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.118 - 0.047 = 0.071$, 根据标准曲线 $y = 0.0092x - 0.0006$, $R^2 = 1$, 计算 $x = 7.78\mu\text{mol/L}$, 按细胞数量计算:
亚铁离子含量($\mu\text{mol}/10^7 \text{ cell}$) $= 0.001x \div N = 0.00312\mu\text{mol/L}$ 。

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] 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.
- [3] Chu C, Wang X, Yang C, Chen F, Shi L, Xu W, Wang K, Liu B, Wang C, Sun D, Ding W. Neutrophil extracellular traps drive intestinal microvascular endothelial ferroptosis by impairing Fundc1-dependent mitophagy. *Redox Biol*. 2023 Nov;67:102906. doi: 10.1016/j.redox.2023.102906. Epub 2023 Oct 4. PMID: 37812880; PMCID: PMC10579540.
- [4] Bai X, Zheng E, Tong L, Liu Y, Li X, Yang H, Jiang J, Chang Z, Yang H. Angong Niuhuang Wan inhibit ferroptosis on ischemic and hemorrhagic stroke by activating PPAR γ /AKT/GPX4 pathway. *J Ethnopharmacol*. 2024 Mar 1;321:117438. doi: 10.1016/j.jep.2023.117438. Epub 2023 Nov 18. PMID: 37984544.
- [5] Yang Y, Wu Q, Shan X, Zhou H, Wang J, Hu Y, Chen J, Lv Z. Ginkgolide B attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury via inhibition of ferroptosis through disrupting NCOA4-FTH1 interaction. *J Ethnopharmacol*. 2024 Jan 10;318(Pt B):116982. doi: 10.1016/j.jep.2023.116982. Epub 2023 Jul 31. PMID: 37532074.
- [6] Yang M, Xia L, Song J, Hu H, Zang N, Yang J, Zou Y, Wang L, Zheng X, He Q, Liu J, Liu F, Liang K, Sun L, Chen L. Puerarin ameliorates metabolic dysfunction-associated fatty liver disease by inhibiting ferroptosis and





inflammation. Lipids Health Dis. 2023 Nov 24;22(1):202. doi: 10.1186/s12944-023-01969-y. PMID: 38001459.

- [7] Jiang Y, Xie G, Alimujiang A, Xie H, Yang W, Yin F, Huang D. Protective Effects of Quercetin against MPP⁺-Induced Dopaminergic Neurons Injury via the Nrf2 Signaling Pathway. Front Biosci (Landmark Ed). 2023 Mar 2;28(3):42. doi: 10.31083/j.fbl2803042. PMID: 37005755.

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



本产品仅供科学研究使用。请勿用于临床、诊断、食品、化妆品检测等用途。

For research use only. Do not use for clinical, diagnostic, food, cosmetic testing and other purposes.