组织及血液亚铁离子含量检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHB4-M96	组织及血液亚铁离子含量试剂盒	96T	微量法

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。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 125mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	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 $FeSO_4·7H_2O$，临用前加入900μL 蒸馏水和20μL 浓硫酸，充分混匀，配制成40 mmol/L 标准液，2-8℃可保存2 周。

操作步骤：

一、样本处理

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。10000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌/细胞：按照细胞数量（10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率200W，超声3 秒，间隔 7 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. 标准溶液的稀释：取10μL 40 mmol/L标准液，加入990μL**蒸馏水**，混匀得到400 μmol/L标准液，将400 μmol/L 标准液用**试剂一**进行稀释得到50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0.78125μmol/L的标准液，**现配现用**。
3. 标准溶液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度(μmol/L)	标准液体积(μL)	**试剂一**体积（μL）	稀释后浓度(μmol/L)
1	400	125	875	50
2	50	500	500	25
3	25	500	500	12.5
4	12.5	500	500	6.25
5	6.25	500	500	3.125
6	3.125	500	500	1.5625
7	1.5625	500	500	0.78125

备注：下述实验中每个标准管需200μL标准液（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	-	-
标准液	-	200	-
试剂一	-	-	200
试剂二	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。		于593nm处吸光值，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。	

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）=$x\times10^{-3}\times$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）=$x\times10^{-3}\times$V提取÷W=0.001x÷W

（4）按细胞/细菌数量计算：亚铁离子含量(μmol/10^6 cell)=$x\times10^{-3}\times$V提取÷N= 0.001x÷N

Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；V提取：加入试剂一的体积，1mL；W：样本质量，g；N：细菌或细胞总数，以10^6计；10^{-3}：单位换算系数，1μmol/L=10^{-3}μmol/mL。

注意事项：

1. 用试剂一稀释得到的标准液容易失效，建议现用现配。

2 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0.4，建议将 样本用**试剂一**适当稀释后再进行测定。注意同步修改计算公式。

3. 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层