

# 组织铁 (Fe) 测定试剂盒说明书

(货号: A039-2-1 比色法 50 管/48 样)

**免责声明:** 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

## 一、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

**试剂一: 100mg/L 铁标准贮备液** 1mL×1 支, 4℃ 保存。临用时取铁标准贮备液 0.1mL 加去离子水 4.9mL (即 50 倍) 稀释成 2mg/L 标准应用液, 现用现配。

**试剂二: 甲粉**×1 支, **乙粉**×1 支, **丙液** 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。使用时将**甲粉**、**乙粉**依次倒入 100mL **丙液**中, 充分混匀, 常温或 37℃ 水浴溶解完全, 配成**显色剂**, 4℃ 避光保存。

## 二、所需仪器及试剂:

可见分光光度计及比色皿 (或酶标仪 (520nm) 及 96 孔板), 95℃ 沸水浴锅, 涡旋混匀器, 离心机, 去离子水或蒸馏水。

## 三、操作步骤:

### 1、样本前处理:

**动物组织的样本前处理:** 准确称取待测动物组织的重量, 按重量 (g): 体积 (mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。

**植物组织的样本前处理:** 准确称取待测植物组织的重量, 按重量 (g): 体积 (mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的匀浆介质 (匀浆介质推荐使用 **0.01mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液**), 冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。

**细胞样本前处理:** (贴壁细胞) 用细胞刮配合等渗 PBS 刮下或用胰酶消化下来 (消化后加入 0.5-1mL 等渗 PBS 冲洗), 再将细胞悬液转移到另一离心管中, 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀; 用等渗缓冲液 (推荐 **0.01mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液**) 清洗 1~2 次, 同样 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀 (若不立即测定, 可直接放 -20℃ 或 -80℃ 冰箱保存, 3 个月内可用); 往每 10<sup>6</sup> 数量细胞沉淀中加入 0.2~0.3mL 的匀浆介质 (推荐 **0.01mol/L pH7~7.4 的 PBS 或 0.9% 生理盐水**) (加完匀浆介质后轻轻混匀细胞溶液, 使其均匀分散, 吸取少量进行细胞计数; 若破碎后测定其蛋白, 则可不进行细胞计数), 冰水浴条件下超声破碎 (功率: 300W, 3~5 秒/次, 间隔 30 秒, 重复 3~5 次) 或手动匀浆, 制备好的匀浆液若比较均匀可不离心直接测定。也可采用裂解液裂解 (推荐 TritonX-100, 1~2%, 裂解 30~40 分钟), 裂解好的液体可不离心直接测定。[注]: 建议细胞数在 100 万个以上 (越多测定效果越好)。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全。

### 2、操作表:

	空白管	标准管	测定管
去离子水 (mL)	0.5		
2mg/L 铁标准应用液 (mL)		0.5	
待测样本 (mL)			0.5
显色剂 (mL)	1.5	1.5	1.5

混匀, 95℃ 以上沸水浴 5 分钟, 常温水冷冷却, 4000 转/分钟, 离心 10 分钟, 取上清液, 0.5 或 1cm 光径, 波长 520nm, 去离子水调零, 分光光度计测各管吸光度值 A (或每管取 200μL 酶标仪 520nm 处读数)。

## 四、计算公式与举例:

### 1、计算公式:

$$\text{组织中铁含量 (mg (}\mu\text{mol) /gprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \text{Cpr}$$

$$\text{组织中铁含量 (mg (}\mu\text{mol) /g组织)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

$$\text{细胞中铁含量 (mg (}\mu\text{mol) /}10^4\text{个细胞)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{\text{细胞数}}{V_{\text{样总}}}$$

**C<sub>标准</sub>:** 标准品浓度, 2mg/L (或 35.81μmol/L);

**Cpr:** 组织匀浆蛋白浓度, gprot/L (prot 指蛋白);

**细胞数:** 细胞破碎时的细胞总数, 万个;

**W:** 组织样本质量, g;

**V<sub>样总</sub>:** 样本前处理时加入的匀浆介质的总体积, L。

**注:** 标准液铁浓度为 2000μg/L, 铁原子量为 55.847, 所以标准管铁含量为 35.81μmol/L。

**注:** 细胞样本计算时, 也可用组织第一种计算公式。

## 五、注意点:

- 若用玻璃器材, 需严格清洗, 避免铁的污染, 建议最好用一次性塑料试管或离心管。
- 若上清浑浊, 可加大离心转速或加入 0.2mL 氯仿涡旋充分混匀 (大概 1 分钟左右) 后再离心后比色。
- 本法测定效果好, 干扰因素少, 适用于多种样本的测定。
- 本法在反应完后, 可吸取显色后上清液 0.2mL 加入 96 孔板 (注意不要吸入气泡), 用酶标仪 520nm 处读数, 计算公式不变。
- 样本中铁含量过低, 可以调整样本的用量 (增加样本量, 显色剂量不变, 空白管去离子水、标准管标准液量同时增加)。

## 六、测定原理:

在酸性溶液和还原剂的作用下, 使运铁蛋白中铁与蛋白分离, 使组织中的高铁还原成亚铁, 后者与双吡啶结合成粉红色的络合物, 在一定范围内, 铁离子的多少与呈色深浅成正比关系。

## 附录 I：标准曲线制作（选做）

### 一、前处理：

**不同浓度标准液制备：**取 100mg/L 标准贮备液用去离子水稀释成以下浓度待测：0mg/L、0.5mg/L、1mg/L、2mg/L、5mg/L、10mg/L、20mg/L、50mg/L。

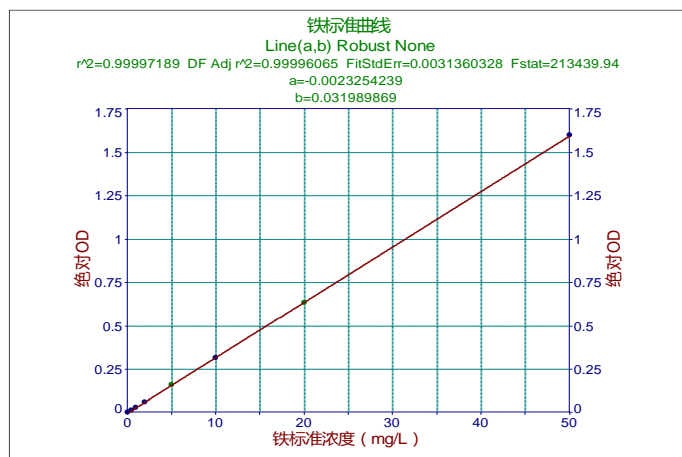
### 二、操作表：

管号	1	2	3	4	5	6	7	8
标准液浓度 (mg/L)	0	0.5	1.0	2.0	5.0	10	20	50
标准液取样量(mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
显色剂(mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

混匀，95℃以上沸水浴 5 分钟，常温水冷却，0.5 或 1cm 光径（与样本测定时相同），波长 520nm，去离子水调零，分光光度计测各管吸光度值 A（或每管取 200μL 酶标仪 520nm 处读数）。

### 三、检测结果：

管号	铁标准浓度 (mg/L)	测定 OD	绝对 OD
1	0	0.003	0.000
2	0.5	0.018	0.015
3	1	0.032	0.029
4	2	0.062	0.059
5	5	0.165	0.162
6	10	0.320	0.317
7	20	0.636	0.633
8	50	1.602	1.599



标准曲线可以不做，按第 1 页的操作表操作后用计算公式计算即可。若是有制作，则可将样本测定管 OD 值减去空白管 OD 值后，代入标曲计算得到的值替换计算公式中的

$$\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$$

继续运算，即可得最终结果。