

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-C48	组织及血液亚铁离子含量试剂盒	48T	常量法

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。

样本中的Fe²⁺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Fe²⁺的含量。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 80mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	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 FeSO₄·7H₂O，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

- 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。
- 细菌/细胞：按照细胞数量（10⁴ 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。
- 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

- 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至593nm，蒸馏水调零。
- 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100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625μmol/L的标准液备用，注意标准溶液 需要现用现配。

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	500	1500	100
2	100	1000	1000	50
3	50	1000	1000	25
4	25	1000	1000	12.5
5	12.5	1000	1000	6.25
6	6.25	1000	1000	3.125
7	3.125	1000	1000	1.5625

备注：下述实验中每个标准管需800μL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	800	-	-
标准液	-	800	-
试剂一	-	-	800
试剂二	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) = $x \times 10^{-3} \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) = 0.001x \div C_{\text{pr}}$

（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(μmol/10⁶ cell) = $x \times 10^{-3} \times V_{\text{提取}} \div N = 0.001x \div N$

V提取：加入试剂一的体积，1mL；Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌或细胞总数，以10⁶计；10³：单位换算系数，1μmol/L=10⁻³μmol/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1，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。