天净沙系列

CAT#:7-C11096-37-0

低温运输，2-8℃保存

天净沙

三价铁离子含量测定试剂盒

Skygen Ferric Lon Assay Kit

使用手册 V0.8

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品用于测定三价铁离子（Ferric Lon，Fe3+，CAS 11096-37-0）含量。其原理是在酸性环境与还原剂共同作用下，运铁蛋白中的铁离子被释放，同时组织内的高铁离子（Fe3+）被还原为亚铁离子（Fe2+）。亚铁离子与双吡啶发生络合反应，生成粉红色络合物。在既定浓度范围内，该显色反应的深浅程度与铁离子含量呈正比。本产品具有如下特点:

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 提供 Fe3+阳性对照，便于在遇到问题时分析原因。
3. 适用于多种样本的测定。
4. 测定效果好，干扰因素少。
5. 足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测或 400 次 250 μL 体系的 96 孔板检测。
6. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
Fe3+测定液	7-C11096-37-0rx	200 mL	250 mL 本色瓶
Fe3+测定反应物干粉 1	7-C11096-37-0a	100 T	5 mL 本色瓶
Fe3+测定反应物干粉 2	7-C11096-37-0b	100 T	5 mL 本色瓶
Fe3+标准液（100 mg/L）	7-C11096-37-0sd	2 mL	2.0 mL 本色管
使用手册	7-C11096-37-0sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，2-8℃保存，有效期一年。

自备试剂

待测样品，样本溶解液，超纯水，比色皿及与之匹配的分光光度计，96 孔板及与之匹配的分光光度计。

使用方法

一、首次使用本试剂盒时需配制下列溶液。

1. 取 Fe3+标准液 0.1 mL 加去离子水 4.9 mL（即 50 倍）稀释成 2 mg/L 标准应用液，现用现配。
2. 将 Fe3+测定反应物干粉 1、Fe3+测定反应物干粉 2 依次倒入 100 mL Fe3+测定液中，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、样本前处理

3. 动物组织的样本：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 ×g，离心 10 分钟，取上清液待测。
4. 植物组织的样本：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 0.01 mol/L pH 7～

7.4 磷酸盐缓冲液），冰水浴条件下机械匀浆，4000 ×g，离心 10 分钟，取上清液待测。

5. 细胞样本：

（a）（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 0.5-1 mL 等渗 PBS 冲洗），再将细胞悬液转移到另一离心管中，1000 ×g，离心 10 分钟，弃上清液，留细胞沉淀；

（b）用等渗缓冲液（推荐 0.01 mol/L 、pH 7～7.4 磷酸盐缓冲液）清洗 1～2 次，同样 1000 ×g，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）；

（c）往每 10^6 数量细胞沉淀中加入 0.2～0.3 mL 的匀浆介质（推荐 0.01 mol/L pH 7～7.4 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；

（d）冰水浴条件下超声破碎（功率：300 W，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。

三、按以下表格操作：

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

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

四、制备标准曲线：（可选）

7. 不同浓度标准液制备：标记 1-8 号共 9 个 2 mL 离心管；取 100 mg/L Fe3+标准液用去离子水稀释成以下浓度待测：0 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L。

8. 按表格加入

	9 个标曲管
标准液取样量	0.5 mL
显色剂	1.5 mL

9. 混匀，95℃以上沸水浴 5 分钟，常温水冷却，0.5 或 1 cm 光径（与样本测定时相同），波长 520 nm，去离子水调零，分光光度计测各管吸光度值 A（或每管取 200 μL 酶标仪 520 nm 处读数）。
10. 标准曲线计算按以下样本公式计算即可，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（（A 测定-A 空白）/（A 标准-A 空白））*C 标准，继续运算，即可得最终结果。

五、计算

11. 组织中铁含量（mg（μmol）/gprot）= （（A 测定-A 空白）/（A 标准-A 空白））*C 标准/ Cpr
12. 组织中铁含量（mg（μmol）/g 组织）= （（A 测定-A 空白）/（A 标准-A 空白））*C 标准/ （W/V 样总）
13. 组织中铁含量（mg（μmol）/10^4细胞）= （（A 测定-A 空白）/（A 标准-A 空白））*C 标准/ （细胞数/V 样总）
14. **C 标准**：标准品浓度，2 mg/L（或 35.81 μmol/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 样总**：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 2000 μg/L，铁原子量为 55.847，所以标准管铁含量为 35.81 μmol/L。细胞样本计算时，也可用组织第一种计算公式。

六、注意事项

15. 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。
16. 若上清浑浊，可加大离心转速或加入 0.2 mL 氯仿涡旋充分混匀(大概 1 分钟左右)后再离心后比色。
17. 本法在反应完后，可吸取显色后上清液 0.2 mL 加入 96 孔板（注意不要吸入气泡），用酶标仪 520 nm 处读数，计算公式不变。
18. 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）。

关联产品	亚铁离子含量测定试剂盒