

货号: ZC-E881

规格: 48T (16 samples)

细胞亚铁比色法测试盒说明书

用途

本试剂盒适用于检测细胞样本中亚铁的含量。

检测原理

铁是生物体内重要的金属元素之一,具有重要的生理作用。亚铁离子是血红素和血红蛋白中的关键元素,同时也在许多生化反应中起到重要作用。样本中的亚铁离子与探针结合,生成的物质在 593 nm 波长处有强吸收峰,在一定范围内其光密度值与亚铁离子浓度成线性相关。

提供试剂和物品

编号	名称	规格(48T)	保存方式
试剂一	缓冲液(Buffer Solution)	45 mL×1 瓶	2-8 °C避光保存6个月
试剂二	对照液(Control Solution)	5 mL×1 瓶	2-8 °C 避光保存6个月
试剂三	显色液(Chromogenic Solution)	5 mL×1 瓶	2-8 °C 避光保存6个月
试剂四	10 mmol/L 铁标准品 (10 mmol/L Iron Standard)	2 mL×1 瓶	2-8 °C 避光保存6个月
试剂五	标准品保护剂 (Standard Protectant)	粉剂×1 瓶	2-8 °C避光保存6个月
	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存,不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂,使用前请先离心,以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器: 酶标仪(590 - 600 nm, 最佳检测波长为 593 nm)

试剂准备

- ① 检测前,试剂盒中的试剂平衡至室温。
- ② 标准品保护液的配制:
取一瓶试剂五,加入15mL试剂一混合均匀。配制好的试剂可在2-8°C保存一个月。
- ③ 100 μmol/L铁标准品的配制:
取10 μL试剂四,与990 μL标准品保护液混合均匀。按需配置,现配现用。



④ 不同浓度标准品的稀释:

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	5	10	15	20	30	40	50
100 $\mu\text{mol/L}$ 标准品 (μL)	0	25	50	75	100	150	200	250
标准品保护液 (μL)	500	475	450	425	400	350	300	250

样本准备

① 样本处理

细胞样本: 取收集好的细胞按约每 1×10^6 个细胞加入 0.2mL 的试剂一, 混匀后放置在冰盒上裂解 10 min, 再 $15000 \times g$ 离心 10 min, 取上清液备用。

② 样本的稀释

在正式检测前, 需选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: $0.4 - 50 \mu\text{mol/L}$, 请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
HepG2 细胞	不稀释	molt-4 细胞	不稀释
Jurkat 细胞	不稀释	HEL 细胞	不稀释

注: 稀释液为试剂一。

实验关键点

1. 为避免污染试剂三, 可用 EP 管将试剂三分装一部分使用。
2. 在使用移液枪向酶标板中加入液体时避免气泡产生。
3. 尽量选取新鲜的细胞样本进行实验。

操作步骤

- (1) 标准孔: 取 $80 \mu\text{L}$ 不同浓度标准品, 分别加入酶标板相应孔中。测定孔: 取 $80 \mu\text{L}$ 待测样本, 加入酶标板相应孔中。对照孔: 取 $80 \mu\text{L}$ 待测样本, 加入酶标板相应孔中。
- (2) 向对照孔中加入 $80 \mu\text{L}$ 试剂二。
- (3) 向测定孔、标准孔中加入 $80 \mu\text{L}$ 试剂三。
- (4) 混匀, 37°C 孵育 10 min。
- (5) 在酶标仪 593 nm 处测定各孔 OD 值。



操作表

	标准孔	对照孔	测定孔
不同浓度标准品 (μL)	80	--	--
待测样本 (μL)	--	80	80
试剂二 (μL)	--	80	--
试剂三 (μL)	80	--	80

37° C 孵育 10 min, 在酶标仪 593 nm 处测定各孔 OD 值。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

细胞样本(以细胞个数进行计算):

$$\text{Fe}^{2+}\text{含量} \frac{(\text{nmol}/10^6)}{=} \frac{\Delta A - b}{a} \div \frac{N}{V} \times f$$

注解:

y: 标准品 OD 值- 空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA: 样本的绝对 OD 值(测定孔 OD 值-对照孔 OD 值)

N: 用于裂解的细胞样本数量/10⁶

V: 细胞样本处理时试剂一加入量 (mL)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

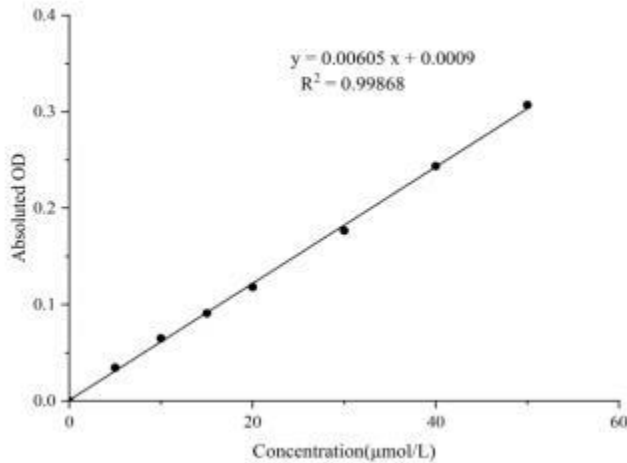


附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.4 - 50 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	1.5 %
灵敏度	0.4 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	1.3 %
平均回收率	99%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)



附录2 实例分析

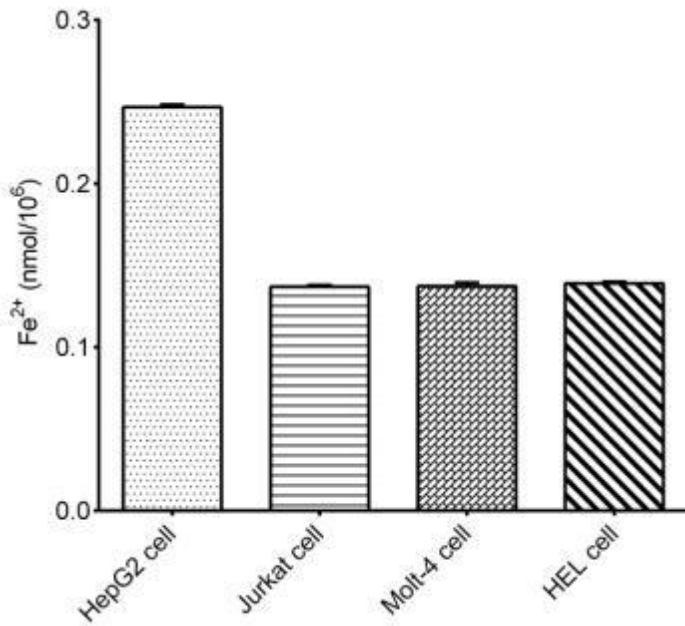
例如检测HepG2细胞(数据仅供参考):

取 1.5×10^6 个 HepG2 细胞加入 0.2 mL 试剂一，经过样本处理后，取 80 μL 按操作表进行检测，其结果如下：标准曲线： $y = 0.00605x + 0.0009$ ，测定孔平均 OD 值为 0.055，对照孔平均 OD 值为 0.043，亚铁离子含量计算结果为：

$$\text{Fe}^{2+} \text{ 含量 (nmol/10}^6) = \frac{0.055 - 0.043 - 0.0009}{0.00605} \div \frac{1.5}{0.2} = 0.24 \text{ nmol/10}^6$$

按照说明书操作，HepG2 细胞（约 1.5×10^6 个细胞加入 0.2 mL 试剂一）、Jurkat、Molt-4、HEL 细胞（约 1×10^6 个细胞加入 0.2 mL 试剂一）中的亚铁含量（如下图所示）：





附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
无法检测出样本含量	细胞中 Fe ²⁺ 含量低于检出限	增加细胞个数
复孔差异大	样本中有固体杂质未去除干净	延长离心时间
	酶标板孔中有气泡	加液时将枪头贴近孔 内壁缓慢加入

声明

- 1) 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将 不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
- 2) 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器， 严格按照说明书进行实验。
- 3) 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
- 4) 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物 浓度过高或过低， 请对样本做适当的稀释或浓缩。
- 5) 若所检样本不在说明书所列样本类型之中， 建议先做预实验验证其检测 有效性。
- 6) 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因 素密切相关。本 公司只对试剂盒本身负责， 不对因使用试剂盒所造成的 样本消耗负责， 使用前请充分考 虑样本可能的使用量， 预留充足的样本。

