铁含量（亚铁嗪比色法）检测试剂盒说明书

（货号：ADS-F-D007　分光法 48 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

在酸性介质中铁从复合物中解离出来，再被还原剂还原成二价铁，并与亚铁嗪生成紫红色化合物，该有色物质在 562nm 处有特征吸收峰，进而计算得出铁含量。适用于检测组织、血清等样品中的铁含量。

二、试剂盒组分与配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 26mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 2 支	4℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.2mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 2mL×1 支	4℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	1. 临用前将试剂混匀； 2. 用试剂三稀释 50 倍(即取 10μL 的标准品至新 EP 管中，再加 490μL 的试剂三)； 3. 稀释后铁标准品浓度为 2μg/mL。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、离心管、可见分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、 样本提取：

① 组织样本：

取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 5min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

② 液体样本：澄清的液体可直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测。

③ 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10^4）：提取液(mL)为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

①打开紫外分光光度计，设置温度 25℃（若仪器无法控温，则等待仪器过自检程序即可），调节

波长到 562nm，蒸馏水调零。

②所有试剂解冻至室温，在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	标准管 （仅做一次）	空白管 （仅做一次）
样本	240		
标准品		240	
蒸馏水			240
试剂一	520	520	520
试剂二	40	40	40
充分混匀，置室温 15min 后，若浑浊则需 3000rpm 离心 5min 后取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于波长 562nm 处读取各管吸光度 A。			

【注】：若 A 测定管大于 0.8，可用蒸馏水对样本上清液进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。

五、结果计算：

1、按照组织质量计算：

铁含量(μg/g)=(C 标准×V1)×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷(V1÷V×W)×D

=2×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白) ÷W×D

铁含量(nmol/g)= (C 标准×V1)×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷(V1÷V×W)×10^3÷Mr×D

=35.81×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白) ÷W×D

2、按蛋白浓度计算：

铁含量(μg/mg prot)=(C 标准×V1)×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷(V1÷V×Cpr)×D

=2×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白) ÷Cpr×D

铁含量(nmol/mg prot)= (C 标准×V1)×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷(V1÷V×Cpr)×10^3÷Mr×D

=35.81×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白) ÷Cpr×D

3、按照液体体积计算：

铁含量(μg/mL)=(C 标准×V1)×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷V1×D

=2×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)×D

铁含量(μmol/L)=(C 标准×V1)×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷V1×10^3÷Mr×D

=35.81×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)×D

4、按细胞数量计算：

铁含量(μg/10^4 cell)=(C 标准×V1)×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷(V1÷V×细胞数量)×D

=2×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白) ÷细胞数量×D

铁含量(nmol/10^4 cell)=(C 标准×V1)×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷(V1÷V×细胞数量)×10^3÷Mr×D

=35.81×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白) ÷细胞数量×D

C 标准---铁标品浓度，2μg/mL；　　V1---加入样本体积，0.24mL；

V---提取液体积，1mL；　　W---样本取样质量，g；

细胞数量---细胞数量，万；　　Mr---铁分子量，55.847。

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。