

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K772-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(590-600 nm)

Elabscience®总铁离子比色法测试盒

Total Iron Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清、动植物组织样本中铁离子的含量。

检测原理

在还原剂的作用下，样本中的铁离子被还原为亚铁离子，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铁离子浓度成线性相关。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	2-8°C避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	显色液 (Chromogenic Solution)	10 mL×1 瓶	10 mL×2 瓶	2-8°C避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	10 mmol/L 铁标准品 (10 mmol/L Iron Standard)	1 mL×1 支	1 mL×2 支	2-8°C避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	提取剂 (Extracting Solution)	40 mL×1 瓶	40 mL×2 瓶	2-8°C避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 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。

② 100 $\mu\text{mol/L}$ 铁标准品的配制：

取20 μL 试剂三与1980 μL 双蒸水混合均匀。按需配置，现配现用。

③ 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	50	100	150	200	300	400	500
试剂一(μL)	1000	950	900	850	800	700	600	500

样本准备

① 样本处理

组织样本：取 0.1 g 新鲜组织块，加入 0.9 mL 试剂四匀浆，12000 × g 离心 10 min，取上清液备用。

血清样本：取血清样本 55 μL 与试剂一 165 μL 混合均匀备用。如果血清样本浑浊，5000 × g 离心 5 min，取澄清部分使用。

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 μmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	2-3	10%大鼠肺组织	不稀释
10%小鼠心组织	不稀释	10%大鼠脾组织	2-3
10%绿萝叶片组织	不稀释	大鼠血清	不稀释
人血清	不稀释	小鼠血清	1-2

注：组织稀释液为试剂四；

血清稀释液为试剂一，血清样本在样本处理过程中已稀释 4 倍。

实验关键点

- ① 为避免污染试剂二，可用 EP 管将试剂二分装一部分使用。
- ② 在使用移液枪向酶标板中加入液体时避免气泡产生。
- ③ 不要使用铁制器具处理和转移样本。

操作步骤

动植物组织的测定

- ① 标准管：取 300 μL 不同浓度标准品，分别加入对应的 1.5 mL 的 EP 管中。
测定管：取 300 μL 样本，加入对应的 1.5 mL 的 EP 管中。
- ② 向步骤①各管中加入 150 μL 试剂二。
- ③ 混合均匀，37°C 孵育 40 min。
- ④ 将各管以 12000 \times g 离心 10 min。
- ⑤ 取 300 μL 步骤④中各管上清液加入酶标板各对应孔中。
- ⑥ 在酶标仪 593 nm 处测定各孔 OD 值。

血清（浆）的测定

- ① 标准孔：取 200 μL 不同浓度标准品，分别加入酶标板相应孔中。
测定孔：取 200 μL 样本，加入酶标板相应孔中。
- ② 向步骤①各孔中加入 100 μL 试剂二。
- ③ 混匀，37°C 孵育 40 min。
- ④ 在酶标仪 593 nm 处测定各孔 OD 值。

操作表

动植物组织的测定

	标准管	测定管
不同浓度标准品(μL)	300	--
待测样本(μL)	--	300
试剂二(μL)	150	150
混匀, 37°C 孵育 40 min, $12000 \times g$ 离心 10 min, 取 300 μL 上清液于酶标板各对应孔中, 在酶标仪 593 nm 处测定各孔 OD 值。		

血清(浆)的测定

	标准孔	测定孔
不同浓度标准品(μL)	200	--
待测样本(μL)	--	200
试剂二(μL)	100	100
混匀, 37°C 孵育 40 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: $y = ax + b$

血清样本:

$$\text{Fe 含量} \begin{matrix} (\mu\text{mol/L}) \end{matrix} = \frac{\Delta A - b}{a} \times 4^* \times f$$

组织样本(以组织湿重进行计算):

$$\text{Fe 含量} \begin{matrix} (\mu\text{mol/kg wet weight}) \end{matrix} = \frac{\Delta A - b}{a} \times f \div \frac{m}{V}$$

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-空白孔 OD 值)

4*: 血清与试剂一混合后被稀释了四倍

V: 样本匀浆液加入量(mL)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

m: 样本匀浆质量 (g)

附录1 关键数据

1. 技术参数

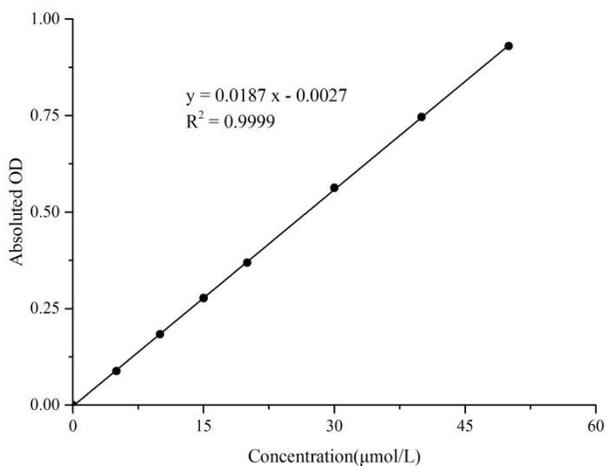
检测范围	0.4-50 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	1.5 %
灵敏度	0.4 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	1.3 %
平均回收率	99 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品，按照操作步骤进行实验，测得各浓度标准品OD值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	5	10	15	20	30	40	50
OD 值	0.048	0.135	0.233	0.327	0.416	0.613	0.797	0.980
	0.048	0.137	0.230	0.324	0.418	0.609	0.792	0.976
平均 OD 值	0.048	0.136	0.232	0.326	0.417	0.611	0.795	0.978
绝对 OD 值	0.000	0.088	0.184	0.278	0.369	0.563	0.747	0.930

②按上表数据绘制标准曲线，如下图所示：



附录2 实例分析

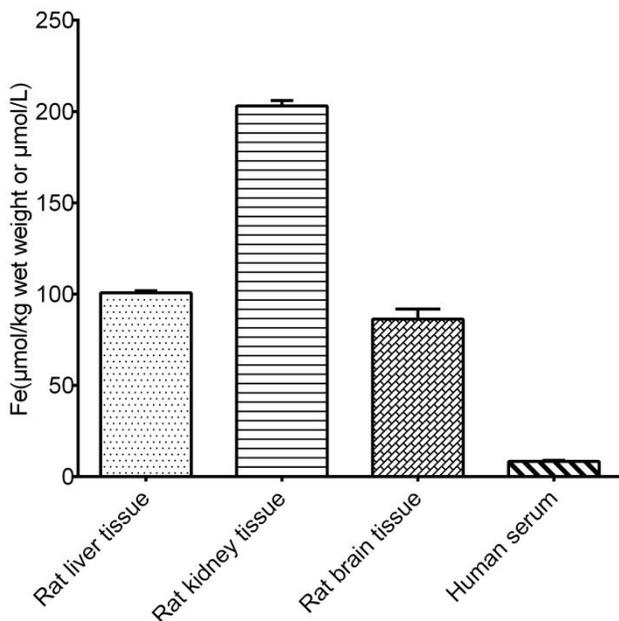
例如检测大鼠肝组织(数据仅供参考):

将10%大鼠肝组织匀浆稀释2倍, 取300 μL 按操作表进行检测, 其结果如下:

标准曲线: $y = 0.0187x - 0.0027$, 测定孔平均OD值为0.144, 空白孔平均OD值为0.042, 铁离子含量计算结果为:

$$\text{Fe 含量} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{kg wet weight}} \right) = \frac{0.144 - 0.042 + 0.0027}{0.0187} \times 2 \div \frac{0.1}{0.9} = 100.78 \mu\text{mol/kg wet weight}$$

按照说明书操作, 测定大鼠肝组织(稀释2倍, 加样量为300 μL)、大鼠肾组织(稀释2倍, 加样量为300 μL)、大鼠脑组织(稀释2倍, 加样量为300 μL)和人血清(加样量为200 μL)中的Fe含量(如下图):



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 含量低于检出限	增加样本匀浆浓度
复孔差异大	样本中有固体杂质未去除干净	延长孵育后离心时间
	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。

附录4 客户发表文献

1. Miao S , Yang L , Xu T ,et al.A novel circPIK3C2A/miR - 31 - 5p/TFRC axis drives ferroptosis and accelerates myocardial injury[J].MedComm, 2024, 5(6).DOI:10.1002/mco2.571.
2. Guo D , Yang X , Yu R ,et al.Macrophage-derived extracellular vesicles represent a promising endogenous iron-chelating therapy for iron overload and cardiac injury in myocardial infarction[J].Journal of Nanobiotechnology, 2024, 22(1).DOI:10.1186/s12951-024-02800-1.
3. Chen J , Yan L , Zhang Y ,et al.Maternal exposure to nanopolystyrene induces neurotoxicity in offspring through P53-mediated ferritinophagy and ferroptosis in the rat hippocampus[J].Journal of nanobiotechnology, 22(1):651.DOI:10.1186/s12951-024-02911-9.
4. Peng J , Dai X , Zhang T ,et al.Copper as the driver of the lncRNA-TCONS-6251/miR-novel-100/TC2N axis: Unraveling ferroptosis in duck kidney[J].International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282.DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.136797.
5. Ye Y , Liu L , Feng Z ,et al.The ERK-cPLA2-ACSL4 axis mediating M2 macrophages ferroptosis impedes mucosal healing in ulcerative colitis[J].Free Radical Biology and Medicine, 2024, 214:219-235.DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2024.02.016.

