（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-K881-M

产品规格：48T(16 samples)/96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(590-600 nm)

Elabscience®细胞亚铁比色法测试盒

Cell Ferrous 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 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)	45 mL×1 瓶	35 mL×2 瓶	2-8°C避光保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	对照液 (Control Solution)	5 mL×1 瓶	10 mL×1 瓶	2-8°C避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色液 (Chromogenic Solution)	5 mL×1 瓶	10 mL×1 瓶	2-8°C避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	1 mmol/L 铁标准品 (1 mmol/L Iron Standard)	2 mL×1 瓶	2 mL×1 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 μmol/L铁标准品的配制：

取100 μL试剂四，与900 μL试剂一混合均匀。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(μmol/L)	**0**	**5**	**10**	**15**	**20**	**25**	**30**	**35**
100 μmol/L 标准品(μL)	0	25	50	75	100	125	150	175
试剂一(μL)	500	475	450	425	400	375	350	325

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 0.2 mL 的试剂一，混匀后放置在冰盒上裂解 10 min，再 15000 × 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：0.4-35 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
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 μL 不同浓度标准品，分别加入酶标板相应孔中。

测定孔：取 80 μL 待测样本，加入酶标板相应孔中。

对照孔：取 80 μL 待测样本，加入酶标板相应孔中。

② 向对照孔中加入 80 μL 试剂二。

③ 向测定孔、标准孔中加入 80 μL 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）：

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

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/10^6

V：细胞样本处理时试剂一加入量(mL)

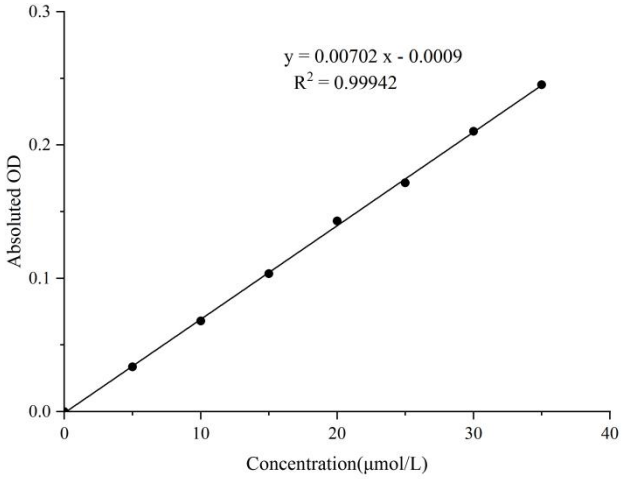
f：样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.4-35 μmol/L	平均批间差	1.5 %
灵敏度	0.4 μmol/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)



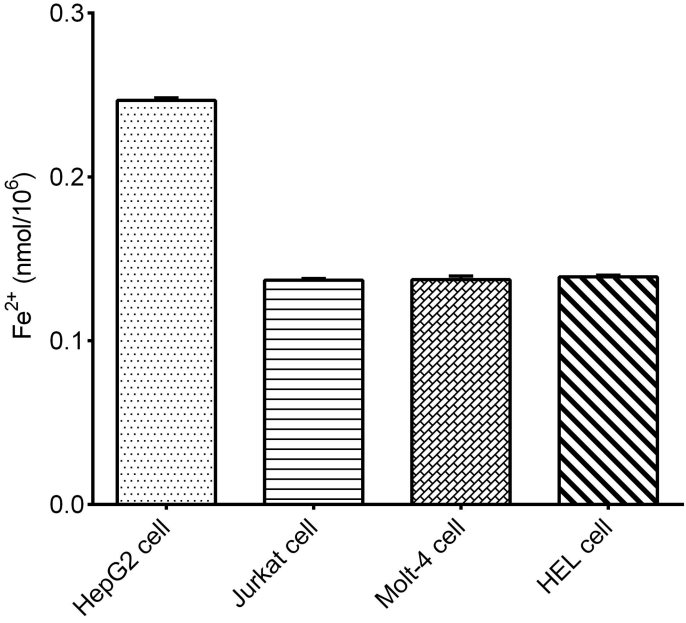
附录2 实例分析

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 = 0.00605 x + 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：

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

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)：



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。

附录4 客户发表文献

1. Liu Z, Liu C, Fan C, et al. E3 ubiquitin ligase DTX2 fosters ferroptosis resistance via suppressing NCOA4-mediated ferritinophagy in non-small cell lung cancer[J]. Drug Resistance Updates, 2024, 77: 101154.

2. Li J, Zhang Q, Yang H, et al. Sequential dual-locking strategy using photoactivated Pt (IV)-based metallo-nano prodrug for enhanced chemotherapy and photodynamic efficacy by triggering ferroptosis and macrophage polarization[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2024, 14(7): 3251-3265.

3. Liu J, Luo Y, Chen S, et al. Deubiquitylase USP52 Promotes Bladder Cancer Progression by Modulating Ferroptosis through Stabilizing SLC7A11/xCT[J]. Advanced Science, 2024, 11(45): 2403995.

4. Zhong Z, Zhou S, Liang Y, et al. Natural flavonoids disrupt bacterial iron homeostasis to potentiate colistin efficacy[J]. Science Advances, 2023, 9(23): eadg4205.

5. Wu Z, Chen K, Mo W, et al. Multimodal enhancement of ferroptosis for synergistic cascade colorectal cancer therapy[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 498: 155048.

6. Li X, Peng X, Zhou X, et al. Small extracellular vesicles delivering lncRNA WAC-AS1 aggravate renal allograft ischemia–reperfusion injury by inducing ferroptosis propagation[J]. Cell Death & Differentiation, 2023, 30(9): 2167-2186.