

CheKine™ 总铁与亚铁离子含量检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1142

规格: 48 T/24 S

96 T/48 S

批号: 见产品标签

	检测范围: 0.78-200 nmol/mL		灵敏度: 0.78 nmol/mL
	适用样本: 动植物组织、细胞、血清（浆）或其他液体		
	保质期: 4℃, 保存 12 个月		

01 背景与原理

铁是人体必需的微量元素之一，它是血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素及其他酶系统的主要成分，帮助氧的运输，促进脂肪氧化。缺乏铁元素容易造成贫血、代谢紊乱，并影响机体的免疫功能。

本试剂盒检测原理是通过还原 Fe^{3+} 为 Fe^{2+} ， Fe^{2+} 在酸性条件下与探针形成蓝色配合物，在 593 nm 处有吸收峰，通过测定该波长吸光度即可计算总铁离子的含量；不针对 Fe^{3+} 进行还原处理时，则可检测亚铁离子的含量。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	120 mL	RT
Reagent I	3 mL	6 mL	4℃
Reagent II	3 mL	6 mL	4℃
Reagent III	6 mL	12 mL	4℃
Standard	Powder×2 vials	Powder×2 vials	4℃

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 593 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水	标准品溶解与稀释用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温箱、涡旋震荡仪、常温离心机、1.5 mL 离心管、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 **2-3** 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。本试剂盒提取液不能用于蛋白含量测定，如需测定蛋白含量，用去离子水重新提取样本后进行蛋白浓度测定。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型	室温保存，初次使用前若为白色浑浊状态，可 37℃ 处理 60 min 至澄清状态
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
Reagent II	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
Reagent III	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
Standard	临用前配制；使用前加入 1 mL 去离子水充分溶解	20 μmol/mL 标准溶液；溶解后-20℃ 分装保存两周有效

05-1-2 标准品配制

使用 50 nmol/mL 标准溶液，可将 20 μmol/mL 标准品以去离子水稀释 400 倍，如将 5 μL 的 20 μmol/mL 标准品加入到 1995 μL 的去离子水中。稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

05-2 样本制备

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即进行实验，样本可在 **-80℃** 保存 **1** 个月。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 **4 h** 内完成样品解冻。为避免铁污染，所有的样本处理和转移操作避免使用铁质器具。

- **动植物组织：**称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，常温匀浆，12000 g，常温离心 10 min，取上清液待测。（建议将动物组织匀浆上清以 Extraction Buffer 稀释 5 倍后检测，结果乘以稀释倍数）
- **细胞：**收集 5×10^6 个细胞到离心管内，加入 1 mL Extraction Buffer，超声波破碎细胞 5 min（功率 20% 或 200W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），12000 g，常温离心 10 min，取上清液待测。
- **血清（浆）等液体样本：**取 500 μ L 样本，加入 500 μ L Extraction Buffer 混合均匀（即稀释 2 倍），12000 g，常温离心 10 min，取上清液待测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备：**预热 30 min 以上，调节波长到 593 nm。
2. **总铁离子检测体系配制：**在 1.5 mL EP 管中按照如下方式操作，空白管和标准管只需做 1-2 次。

试剂	空白管 (μ L)	标准管 (μ L)	测定管 (μ L)
样本	0	0	100
50 nmol/mL Standard	0	100	0
去离子水	100	0	0
Reagent I	100	100	100
Reagent III	100	100	100

充分混匀，37℃孵育 30 min，12000 g，常温离心 5 min，吸取 200 μ L 上清液至 96 孔板中，记录 593 nm 处吸光值

3. **亚铁离子检测体系配制：**在 1.5 mL EP 管中按照如下方式操作，空白管和标准管只需做 1-2 次。

试剂	空白管 (μ L)	标准管 (μ L)	测定管 (μ L)
样本	0	0	100
50 nmol/mL Standard	0	100	0
去离子水	100	0	0
Reagent II	100	100	100
Reagent III	100	100	100

充分混匀，37℃孵育 30 min，12000 g，常温离心 5 min，吸取 200 μ L 上清液至 96 孔板中，记录 593 nm 处吸光值

4. **吸光度检测：**总铁离子检测体系中空白孔记为 $A_{Total \text{ 空白}}$ ，标准孔记为 $A_{Total \text{ 标准}}$ ，测定孔记为 $A_{Total \text{ 测定}}$ ；亚铁离子检测体系中空白孔记为 $A_{Fe2+ \text{ 空白}}$ ，标准孔记为 $A_{Fe2+ \text{ 标准}}$ ，测定孔记为 $A_{Fe2+ \text{ 测定}}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)>进入“技术中心”>查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{Total \text{ 测定}} = A_{Total \text{ 测定}} - A_{Total \text{ 空白}}$ ， $\Delta A_{Total \text{ 标准}} = A_{Total \text{ 标准}} - A_{Total \text{ 空白}}$ ， $\Delta A_{Fe2+ \text{ 测定}} = A_{Fe2+ \text{ 测定}} - A_{Fe2+ \text{ 空白}}$ ，
 $\Delta A_{Fe2+ \text{ 标准}} = A_{Fe2+ \text{ 标准}} - A_{Fe2+ \text{ 空白}}$ 。

2. 总铁离子含量的计算

- 按蛋白浓度计算：

$$\text{总铁离子(nmol/mg prot)} = \Delta A_{\text{Total 测定}} \div \Delta A_{\text{Total 标准}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times n = 50 \times \Delta A_{\text{Total 测定}} \div \Delta A_{\text{Total 标准}} \div C_{\text{pr}} \times n$$

- 按细胞数量计算：

$$\text{总铁离子(nmol/10}^6 \text{ cell)} = \Delta A_{\text{Total 测定}} \div \Delta A_{\text{Total 标准}} \times C_{\text{标准}} \div N \times V_{\text{样总}} \times n = 50 \times \Delta A_{\text{Total 测定}} \div \Delta A_{\text{Total 标准}} \div N \times n$$

- 按样本鲜重计算：

$$\text{总铁离子(nmol/g)} = \Delta A_{\text{Total 测定}} \div \Delta A_{\text{Total 标准}} \times C_{\text{标准}} \div W \times V_{\text{样总}} \times n = 50 \times \Delta A_{\text{Total 测定}} \div \Delta A_{\text{Total 标准}} \div W \times n$$

- 按液体体积计算：

$$\text{总铁离子(nmol/mL)} = \Delta A_{\text{Total 测定}} \div \Delta A_{\text{Total 标准}} \times C_{\text{标准}} \times F = 100 \times \Delta A_{\text{Total 测定}} \div \Delta A_{\text{Total 标准}}$$

$C_{\text{标准}}$ ：检测的标准品浓度，50 nmol/mL； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； $V_{\text{样总}}$ ：提取出的样本总体积，1 mL； N ：细胞数量，以 10^6 为单位，如 5×10^6 个细胞为 5； n ：组织样本稀释倍数； W ：样本质量，g； F ：液体样本稀释倍数，2。

3. 亚铁离子含量的计算

- 按蛋白浓度计算：

$$\text{亚铁离子(nmol/mg prot)} = \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{测定}} \div \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{标准}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times n = 50 \times \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{测定}} \div \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times n$$

- 按细胞数量计算：

$$\text{亚铁离子(nmol/10}^6 \text{ cell)} = \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{测定}} \div \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{标准}} \times C_{\text{标准}} \div N \times V_{\text{样总}} \times n = 50 \times \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{测定}} \div \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{标准}} \div N \times n$$

- 按样本鲜重计算：

$$\text{亚铁离子(nmol/g)} = \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{测定}} \div \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{标准}} \times C_{\text{标准}} \div W \times V_{\text{样总}} \times n = 50 \times \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{测定}} \div \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{标准}} \div W \times n$$

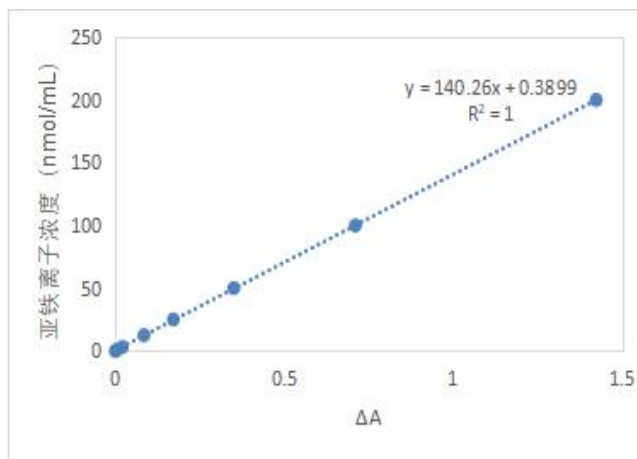
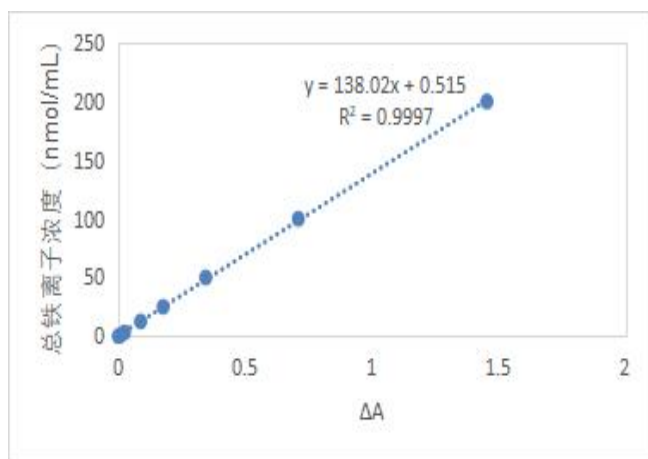
- 按液体体积计算：

$$\text{亚铁离子(nmol/mL)} = \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{测定}} \div \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times F = 100 \times \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{测定}} \div \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{标准}}$$

$C_{\text{标准}}$ ：检测的标准品浓度，50 nmol/mL； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； $V_{\text{样总}}$ ：提取出的样本总体积，1 mL； N ：细胞数量，以 10^6 为单位，如 5×10^6 个细胞为 5； n ：组织样本稀释倍数； W ：样本质量，g； F ：液体样本稀释倍数，2。

07 结果展示

将 20 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品以去离子水梯度稀释为 0.78、3.12、12.5、25、50、100、200 nmol/mL，检测的总铁离子标准曲线： $y = 138.02x + 0.515$ ， $R^2 = 0.9997$ ；亚铁离子标准曲线： $y = 140.26x + 0.3899$ ， $R^2 = 1$ 。



示例-1: 取 0.1 g 兔肝脏，按上述步骤操作，测得 $\Delta A_{\text{Total 测定}} = A_{\text{Total 测定}} - A_{\text{Total 空白}} = 0.164 - 0.032 = 0.132$ ， $\Delta A_{\text{Total 标准}} = A_{\text{Total 标准}} - A_{\text{Total 空白}} = 0.337 - 0.032 = 0.305$ ， $\Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{测定}} = A_{\text{Fe}^{2+} \text{测定}} - A_{\text{Fe}^{2+} \text{空白}} = 0.151 - 0.035 = 0.116$ ， $\Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{标准}} = A_{\text{Fe}^{2+} \text{标准}} - A_{\text{Fe}^{2+} \text{空白}} = 0.338 - 0.035 = 0.303$ ，按样本鲜重计算含量得：总铁离子(nmol/g) = $50 \times \Delta A_{\text{Total 测定}} \div \Delta A_{\text{Total 标准}} \div W \times n = 216.4$ nmol/g，亚铁离子(nmol/g) = $50 \times \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{测定}} \div \Delta A_{\text{Fe}^{2+} \text{标准}} \div W \times n = 191.4$ nmol/g。

08 FAQ

- 检测得到的样本 $\Delta A_{\text{Total 测定}}$ 和 $\Delta A_{\text{Fe}^{2+}\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办？

如果样本的 $\Delta A_{\text{Total 测定}}$ 或 $\Delta A_{\text{Fe}^{2+}\text{测定}} > 1.4$ ，需先检查样本检测过程中是否接触过铁质物品，若未接触过再用 Extraction Buffer 适当稀释后进行实验，结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。如果样本的 $\Delta A_{\text{Total 测定}}$ 或 $\Delta A_{\text{Fe}^{2+}\text{测定}} < 0.005$ ，可适当提高样本量。

- 样本或检测过程中混入氧化剂或还原剂会有什么影响？

如果样本或检测过程中混入氧化剂，可能会导致亚铁离子含量测值偏低，对总铁离子含量测值影响较小。如果样本或检测过程中混入还原剂，可能会导致亚铁离子含量测值偏高，对总铁离子含量测值影响较小。例如动物组织样本中会含有一定的抗氧化物质，导致可检出的总铁离子主要为亚铁形式，可尝试 5 倍稀释样本后进行检测。

- 当 Fe^{3+} 或 Fe^{2+} 的浓度很低时，检测结果会有什么表现？

若亚铁离子浓度与总铁离子浓度的相对偏差在 $\pm 10\%$ 以内时，表明样本提取液中仅含少量或不含有 Fe^{3+} 。若亚铁离子浓度测值低于试剂盒灵敏度时，表明样本提取液中仅含少量或不含有 Fe^{2+} 。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1410	CheKine™ 谷丙转氨酶（ALT/GPT）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1420	CheKine™ 谷草转氨酶（AST/GOT）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1430	CheKine™ 脯氨酸（PRO）含量检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 总铁与亚铁离子含量检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB1142)

