

CheKine™ Pro 细胞亚铁离子 (Fe²⁺) 荧光检测试剂盒

货号: KTB9060

规格: 200 T/500 T/2500 T

批号: 见产品标签

	适用样本: 活细胞	检测仪器: 荧光显微镜/流式细胞仪/荧光酶标仪
	荧光激发/发射: Ex/Em=545 nm/580 nm	
	保质期: -20℃, 避光保存 12 个月	

01 背景与原理

细胞内几乎没有真正自由水合的 Fe²⁺, 铁绝大部分都牢牢绑定在蛋白质 (铁蛋白、血红素、铁硫簇等) 里。我们通常说的胞内 Fe²⁺ 浓度, 指的是不稳定铁池 (Labile Iron Pool, LIP) 中可被螯合剂接近、氧化还原活跃的那一小部分 Fe²⁺, 细胞内铁稳态的精确调控对细胞存活至关重要, 铁浓度的失衡可能导致多种疾病的发生。铁浓度过高时, 亚铁离子可通过 Fenton 反应催化产生羟基自由基, 进而引发脂质过氧化、蛋白质变性和 DNA 损伤, 与癌症、阿尔茨海默病等重大疾病密切相关; 铁浓度过低会阻碍血红素合成, 引发缺铁性贫血, 导致组织缺氧、免疫力下降等临床症状。

本试剂盒基于红色荧光探针 RhoNox-4, 快速灵敏地检测活细胞内 Fe²⁺。RhoNox-4 具有高选择性和高灵敏度, 能特异性结合亚铁离子, 而不受钙、镁、锌和铜等常见金属离子的干扰。该探针还具备优异的细胞膜通透性、低细胞毒性和稳定性, 可用于活细胞内亚铁离子的实时荧光成像, 并支持长时间监测及高通量检测。与亚铁离子结合后, 其荧光信号显著增强, 从而实现对活细胞内游离亚铁离子的精准检测。RhoNox-4 适用于细胞的铁代谢、氧化应激以及铁死亡 (Ferroptosis) 等的研究。RhoNox-4 在细胞内与亚铁离子结合后的最大激发波长为 545 nm, 发射波长为 580 nm。

02 包装清单

试剂盒组分	规格			储存要求
	200 T	500 T	2500T	
Assay Buffer	20 mL	50 mL	100 mL×2+50 mL	4℃
RhoNox-4 (1000X)	20 μL	50 μL	250 μL	-20℃避光保存
Hoechst 33342 (1000X)	20 μL	50 μL	250 μL	-20℃避光保存

注: 以 200T 包装规格为例, 荧光显微镜染色每样本使用 100 μL 的 RhoNox-4 Staining Solution, 可检测 200 次; 流式细胞仪样本检测每样本使用 500 μL 的 RhoNox-4 Staining Solution, 可检测 40 次; 荧光酶标仪检测每样本使用 100 μL 的 RhoNox-4 Staining Solution, 可检测 200 次。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪	荧光酶标仪与荧光显微镜 Ex/Em=545 nm/580 nm，流式推荐 PE 通道
耗材	96 孔/24 孔/12 孔/6 孔细胞板	普通，全黑，黑色透底细胞培养板
试剂	磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）、去离子水	/
其他	离心机、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

- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Assay Buffer	即用型；使用前请平衡至室温	用于稀释 RhoNox-4 及 Hoechst 33342 探针
RhoNox-4 (1000X)	即用型；使用前请平衡至室温	可分装避光保存避免反复冻融
Hoechst 33342 (1000X)	即用型；使用前请平衡至室温	可分装避光保存避免反复冻融
RhoNox-4 Staining Solution	每 1 mL Assay buffer 加入 1 μ L RhoNox-4 (1000 $\times$)与 1 μ L Hoechst 33342 (1000 $\times$)，混匀	现用现配，使用时尽量注意避光

可选做：Hoechst 33342 染色为可选，可根据实际需求进行选做。Hoechst 33342 为蓝色荧光，最大激发波长为 346 nm，最大发射波长为 460 nm。

05-2 实验步骤

05-2-1 荧光显微镜检测

1. 对于贴壁细胞

- (1) 在相应的条件中培养或诱导细胞，再进行后续实验。
- (2) 吸除培养液后，用 PBS 清洗细胞 2 次。
- (3) 加入适当体积的 RhoNox-4 Staining Solution 到细胞中，建议 96 孔板每孔加入 100 μ L，24 孔板每孔加入 300 μ L，12 孔板每孔加入 500 μ L，6 孔板每孔加入 1 mL，37℃避光孵育 0.5~2 h。
- (4) 孵育结束后，可直接进行荧光显微镜检测（Ex/Em=545 nm/580 nm）。

注意：不同种类与状态的细胞需要适当调整孵育时间以及 RhoNox-4 的工作浓度，可依据实际情况在 0.5 $\times$ ~2.5 $\times$ 之间适当调整。

2. 对于悬浮细胞

- (1) 在相应的条件中培养或诱导细胞，再进行后续实验。
- (2) 以 300 g 离心 5 min 收集细胞 ($5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$)，用 PBS 洗涤 2 次。
- (3) 加入 100 μ L 的 RhoNox-4 Staining Solution 到细胞中，37℃避光孵育 0.5~2 h。
- (4) 将染色好的细胞悬浮置于玻片上，用盖玻片盖住细胞，在荧光显微镜下观察 (Ex/Em=545 nm/580 nm)。

注意：染色后洗涤可能导致染色变弱，因此建议孵育完成后不洗涤直接进行检测，以确保检测结果的准确性。

05-2-2 流式细胞仪检测

- (1) 在相应的条件中培养或诱导细胞，再进行后续实验。
- (2) 对于悬浮细胞，300 g 离心 5 min 收集细胞，用 PBS 清洗 2 次，弃去 PBS。对于贴壁细胞，先用胰蛋白酶（不含 EDTA）消化细胞，然后 300 g 离心 5 min 离心收集细胞，用 PBS 清洗 2 次，弃去 PBS。
- (3) 加入 500 μ L 的 RhoNox-4 Staining Solution 到细胞中，37℃避光孵育 0.5~2 h。
- (4) 孵育完成后，可直接进行流式细胞仪检测 (PE 通道)。

注意：不同种类与状态的细胞需要适当调整孵育时间以及 RhoNox-4 的工作浓度，可依据实际情况在 0.5×~2.5×之间适当调整。

05-2-3 荧光酶标仪检测

1. 对于贴壁细胞

- (1) 建议将细胞接种于 96 孔全黑细胞培养板中，在相应的条件中培养或诱导细胞，再进行后续实验：
- (2) 吸除培养液后，用 PBS 清洗细胞 2 次。
- (3) 加入 100 μ L 的 RhoNox-4 Staining Solution 到细胞中，37℃避光孵育 0.5~2 h。
- (4) 孵育完成后，可直接进行荧光酶标仪检测 (Ex/Em=545 nm/580 nm，顶读)。

注意：若使用 96 孔黑色透底细胞培养板，需将荧光酶标仪设置为底读模式。

2. 对于悬浮细胞

- (1) 在相应的条件中培养或诱导细胞，再进行后续实验。
- (2) 以 300 g 离心并收集细胞 ($5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$)，用 PBS 洗涤 2 次。
- (3) 加入 100 μ L 的 RhoNox-4 Staining Solution 到细胞中，37℃避光孵育 0.5~2 h。
- (4) 孵育完成后，可直接进行荧光酶标仪检测 (Ex/Em=545 nm/580 nm)。

05-3 急性铁过载细胞模型处理

诱导细胞内亚铁离子浓度变化可使用转铁蛋白、铁死亡诱导剂如 Erastin、硫酸亚铁等。硫酸亚铁可用于快速调控细胞内亚铁离子浓度变化。具体处理方法如下：

- (1) 试剂准备：用去离子水配制 20 mM 的硫酸亚铁母液；使用时以无血清培养基稀释得到 100~200 μ M 的硫酸亚铁处理液。
- (2) 细胞处理：使用硫酸亚铁处理液处理待检测细胞，置于细胞培养箱 37℃孵育 2 h。不同种类与状态的细胞孵育时间可进行适当调整，孵育结束后可用 PBS 洗涤 2 次，随后可使用 RhoNox-4 Staining Solution 进行染色。

06 结果示例

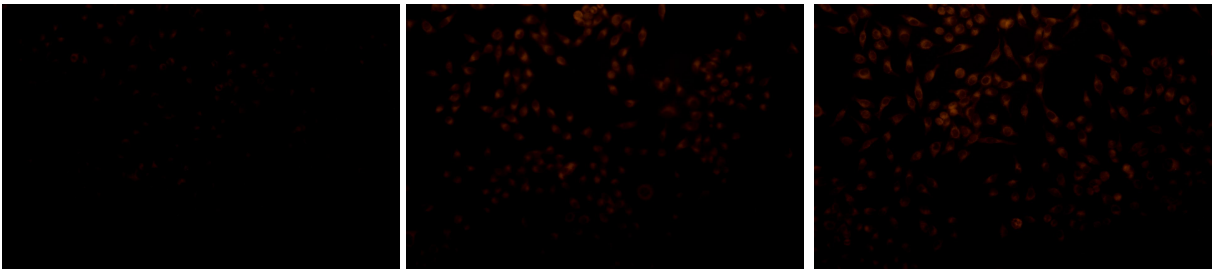


Figure 1. HeLa 细胞用无血清培养基（左）、100 μM FeSO_4 （中）、200 μM FeSO_4 （右）处理 2 h，然后使用 RhoNox-4 Staining Solution 处理 30 min，用荧光显微镜检测。可以看到 HeLa 细胞内存在亚铁离子，经 FeSO_4 处理后细胞内亚铁离子含量明显增加，红色荧光强度随处理的 FeSO_4 浓度升高而明显提升。

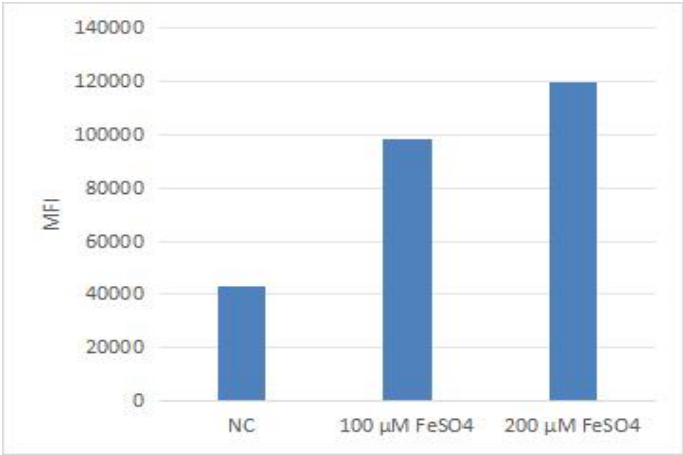


Figure 2. Jurkat 细胞用完全培养基（NC）、100 μM FeSO_4 、200 μM FeSO_4 处理 2 h，然后使用 RhoNox-4 Staining Solution 处理 2 h，用流式细胞仪 PE 通道检测平均荧光强度。

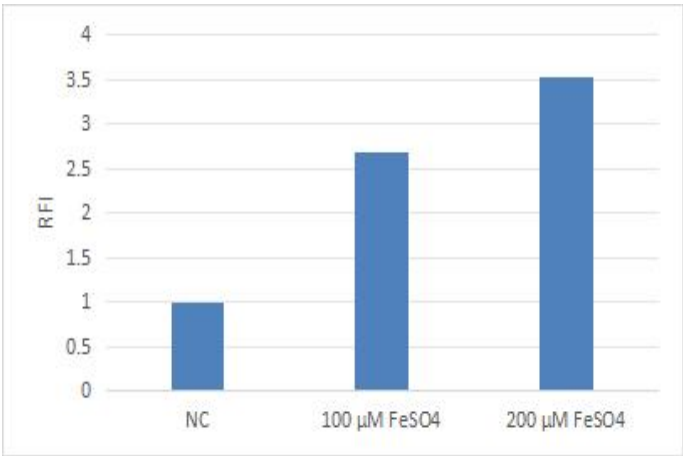


Figure 3. Jurkat 细胞用完全培养基（NC）、100 μM FeSO_4 、200 μM FeSO_4 处理 2 h，然后使用 RhoNox-4 Staining Solution 处理 0.5 h，用荧光酶标仪检测相对荧光强度（Ex/Em=545 nm/580 nm）。

07 FAQ

1.RhoNox-4 探针会受到亚铁离子之外的离子干扰么？

RhoNox-4 探针对于亚铁离子的特异性很高，其他离子与探针几乎不产生荧光信号。

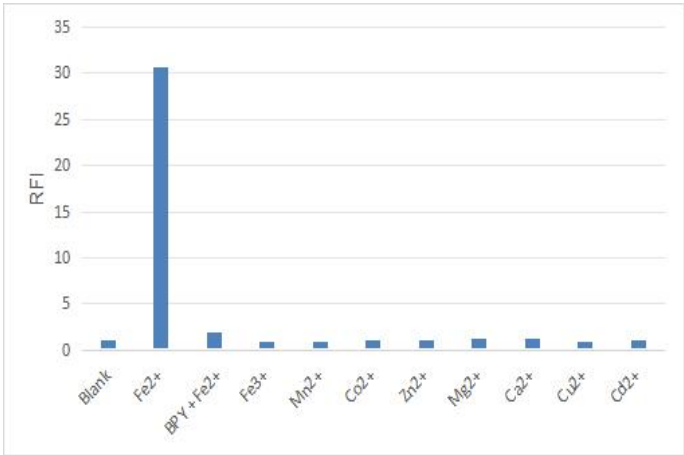


Figure 4. 以未添加金属离子的荧光信号作为空白（Blank），对比加入不同金属离子后的荧光结果， Fe²⁺与 Fe³⁺浓度为 40 μM，其余金属离子浓度均为 1 mM。与 RhoNox-4 Staining Solution 孵育 30 min 后，使用荧光酶标仪检测荧光强度 (Ex/Em=545 nm/580 nm)，以 Blank 组荧光强度进行归一化处理。

2.RhoNox-4 Staining Solution 孵育完后清洗 2 次会有影响么？

染色后洗涤可能导致染色变弱，因此建议孵育完成后不洗涤直接进行检测，以确保检测结果的准确性。

3.酚红或血清对于本试剂盒的检测是否会有干扰？

酚红或血清对于 RhoNox-4 探针的检测效果存在干扰，可通过 PBS 清洗细胞以降低影响的程度。

08 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1114	CheKine™ 细胞总铁离子含量检测试剂盒（微量法）
KTB1116	CheKine™ 细胞亚铁离子含量检测试剂盒（微量法）
KTB1050	CheKine™ 脂质过氧化（丙二醛）含量检测试剂盒（微量法）
KTB9050	CheKine™ Pro 丙二醛（MDA）含量检测试剂盒（荧光法）

CheKine™ Pro 细胞亚铁离子 (Fe²⁺) 荧光检测试剂盒

(Abbkine 货号：KTB9060)

