CheKine™ 细胞亚铁离子含量检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1116　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 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：细胞		
	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，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。

本试剂盒检测原理是 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 Fe^{2+}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	6 mL	12 mL	4℃
Reagent Ⅱ	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
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

配制 50 nmol/mL 标准溶液，将 20 μmol/mL 标准品以去离子水稀释 400 倍，如取 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。

- **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。

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. **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（μL）	标准管（μL）	测定管（μL）
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 Ⅱ	100	100	100
充分混匀，37℃孵育 30 min，12000 g，常温离心 5 min，吸取 200 μL 上清液至 96 孔板中，记录 593 nm 处吸光值			

3. **吸光度检测：**空白孔记为 $A_{空白}$，标准孔记为 $A_{标准}$，测定孔记为 $A_{测定}$。

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] > 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$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{空白}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$

2. 细胞亚铁离子含量计算

- 按样本蛋白浓度计算：

亚铁离子(nmol/mg prot)=$\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\times C_{标准}\div Cpr\times n$**=50×$\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\div Cpr\times n$**

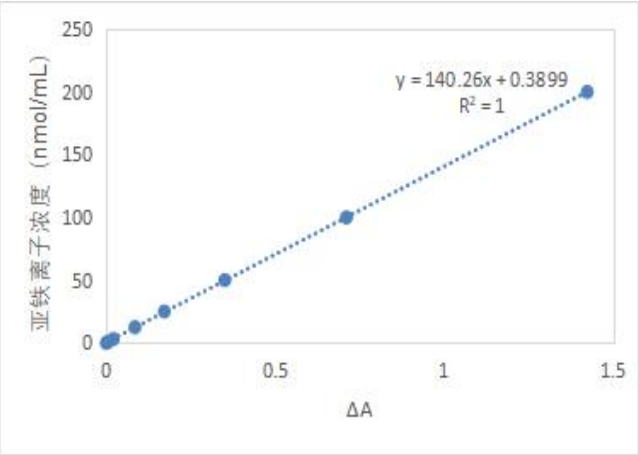
- 按细胞数量计算：

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

$C_{标准}$：检测的标准品浓度，50 nmol/mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；$V_{样总}$：提取出的样本总体积，1 mL；N:细胞数量，以 10^6 为单位，5；n：样本稀释倍数。

07 结果展示

将 20 μmol/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，检测的亚铁离子标准曲线：y=140.26x+0.3899，R^2=1。



示例-1：取 5×10^6 个 293 细胞，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{空白}=0.045-0.037=0.008$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}=0.386-0.037=0.349$，按细胞数量计算得：亚铁离子$(nmol/10^6) =50\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\div N\times n=0.229\ nmol/10^6$。

08 FAQ

- **检测得到的样本$\Delta A_{测定}$过高或者过低怎么办？**

如果样本的$\Delta A_{测定}>1.4$，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$\Delta A_{测定}<0.005$，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。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。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1113	CheKine™ 总铁离子含量检测试剂盒（微量法）
KTB1114	CheKine™ 细胞总铁离子含量检测试剂盒（微量法）
KTB1115	CheKine™ 亚铁离子含量检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 细胞亚铁离子含量检测流程示意图

（Abbkine 货号 ： KTB1116）

样本处理



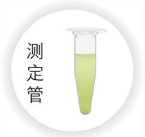
收集清洗的细胞
1 mL Extraction Buffer
超声波破碎5 min（功率20%或200 W，超声3 s，间隔7 s，重复30次）



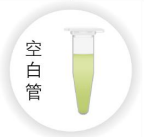
12000 g，常温离心10 min，取上清



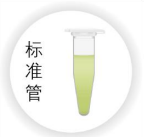
体系配置



样本 100 μL
Reagent Ⅰ 100 μL
Reagent Ⅱ 100 μL



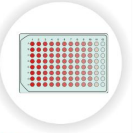
去离子水 100 μL
Reagent Ⅰ 100 μL
Reagent Ⅱ 100 μL



50 nmol/mL Standard 100 μL
Reagent Ⅰ 100 μL
Reagent Ⅱ 100 μL

充分混匀，37℃孵育30 min，
12000 g，常温离心5 min，吸取200 μL上清至96孔板

数据检测



测定593 nm处的吸光度
结果计算