



CheKine™ 细胞亚铁离子含量检测试剂盒（微量法）

Cat #: KTB1116

Size: 48 T/48 S

96 T/96 S

	细胞亚铁离子含量检测试剂盒（微量法）		
REF	货号：KTB1116	LOT	批号：见产品标签
	检测范围：0.78-50 nmol/mL		灵敏度：0.78 nmol/mL
	适用样本：细胞		
	保质期：4°C，避光保存 6 个月		

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。CheKine™ 细胞亚铁离子含量检测试剂盒（微量法）可检测细胞生物样本。在该试剂盒中，细胞经裂解后，样本中的 Fe²⁺在酸性条件下与三吡啶基三嗪形成蓝色配合物，在 593 nm 处有吸收峰，通过测定该波长吸光度即可计算 Fe²⁺的含量。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	30 mL	60 mL	4°C，避光保存
Reagent I	7 mL	14 mL	4°C，避光保存
Reagent II	20 mL	40 mL	4°C，避光保存
Standard	Powder×2 vials	Powder×4 vials	4°C，避光保存

注意：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。

自备耗材

- 酶标仪或可见分光光度计（能测 593 nm 处的吸光度）
- 96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头、1.5 mL 离心管
- 恒温箱、制冰机、低温离心机
- 去离子水、PBS、氯仿

试剂准备

Extraction Buffer: 即用型；使用前，平衡到室温。4°C避光保存。

Reagent I: 即用型；使用前，平衡到室温。4°C避光保存。为避免污染，建议将 Reagent I 分装后使用。

Reagent II: 即用型；使用前，平衡到室温。4°C避光保存。

Standard: 临用前配制；每瓶加入 1,020 μL Reagent II 充分溶解，即 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ Fe^{2+} 标准品；当天用完。

100 nmol/mL Fe^{2+} 标准品: 10 μL 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ Fe^{2+} 标准品用 990 μL Reagent II 稀释；使用 100 nmol/mL Fe^{2+} 标准品，按照下表所示，进一步稀释成标准品：

序号	Standard 体积 (μL)	Reagent II 体积 (μL)	浓度 (nmol/mL)
Std.1	400 μL of 100 nmol/mL Standard	400	50
Std.2	400 μL of Std.1 (50 nmol/mL)	400	25
Std.3	400 μL of Std.2 (25 nmol/mL)	400	12.5
Std.4	400 μL of Std.3 (12.5 nmol/mL)	400	6.25
Std.5	400 μL of Std.4 (6.25 nmol/mL)	400	3.13
Std.6	400 μL of Std.5 (3.13 nmol/mL)	400	1.56
Blank	0	400	0

注意：每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

样本制备

注意：建议使用新鲜样本。亚铁离子易被氧化，样本放置时间较长或反复冻融会造成结果不准确。

细胞：收集 1,000 万细胞到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 0.5 mL Extraction Buffer，置冰上裂解 10 min，每 2 min 上下颠倒混匀一次，裂解完成后置冰上待测。

注意：1. 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。如需测定蛋白浓度，推荐使用 Abbkine 货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）进行样本蛋白质浓度测定。

2. 为避免铁污染，所有的样本处理和转移操作不要使用铁制器具。如有需要，可用 1%稀盐酸浸泡处理所用器具 4 h。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 593 nm，可见分光光度计用去离子水调零。

2. 操作表（下述操作在 1.5 mL EP 管中操作）：

试剂	空白管 (μL)	标准管 (μL)	测定管 (μL)
样本	0	0	200
Standard	0	200	0
Reagent II	200	0	0
Reagent I	100	100	100

充分混匀，37°C 孵育 10 min，流水冷却至室温，空白管和标准管取 200 μL 至 96 孔板或微量玻璃比色皿中，记录 593 nm 处吸光值。测定管进行以下操作：

氯仿	0	0	100
----	---	---	-----

充分涡旋震荡 2 min，10,000 g，室温离心 5 min，小心吸取测定管上层无机相 200 μL 至 96 孔板或微量玻璃比色皿中，记录 593 nm 处吸光值

3. 空白孔记为 $A_{\text{空白}}$ ，标准孔记为 $A_{\text{标准}}$ ，测定孔记为 $A_{\text{测定}}$ 。计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。

注意：1. 空白管和标准管只需做 1-2 次。实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 $\Delta A_{\text{测定}}$ 小于 0.005 可适当加大

样本量。如果 $\Delta A_{\text{测定}}$ 大于 0.3，样本可用 **Extraction Buffer** 进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。2. 每次检测不要超过三个样本，反应完成后需立即完成吸光值检测，避免造成实验误差。3. 氯仿会腐蚀 96 孔板，所以在吸取上层无机相时注意不要吸到下层氯仿。

结果计算

注意：我们为您提供的计算公式，包括推导过程计算公式和简洁计算公式。两者完全相等。建议以加粗的简洁计算公式为最终计算公式。

1. 标准曲线的绘制

以标准溶液浓度为 x 轴， $\Delta A_{\text{标准}}$ 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 带入方程得到 x (nmol/mL)。

2. 亚铁离子含量的计算：

(1) 按蛋白浓度计算

亚铁离子(nmol/mg 蛋白)=($V_{\text{样}} \times x$) \div ($V_{\text{样}} \times \text{Cpr}$)= **$x \div \text{Cpr}$**

(2) 按细胞数量计算：

亚铁离子(nmol/ 10^6 cell)=($V_{\text{样}} \times x$) \div ($n \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}$)= **$0.5x \div n$**

$V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.2 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入 Extraction Buffer 体积, 0.5 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; n: 细胞数量, 以 10^6 计。

结果展示

以下数据仅供参考，实验者需根据自己的实验对样品进行检测。

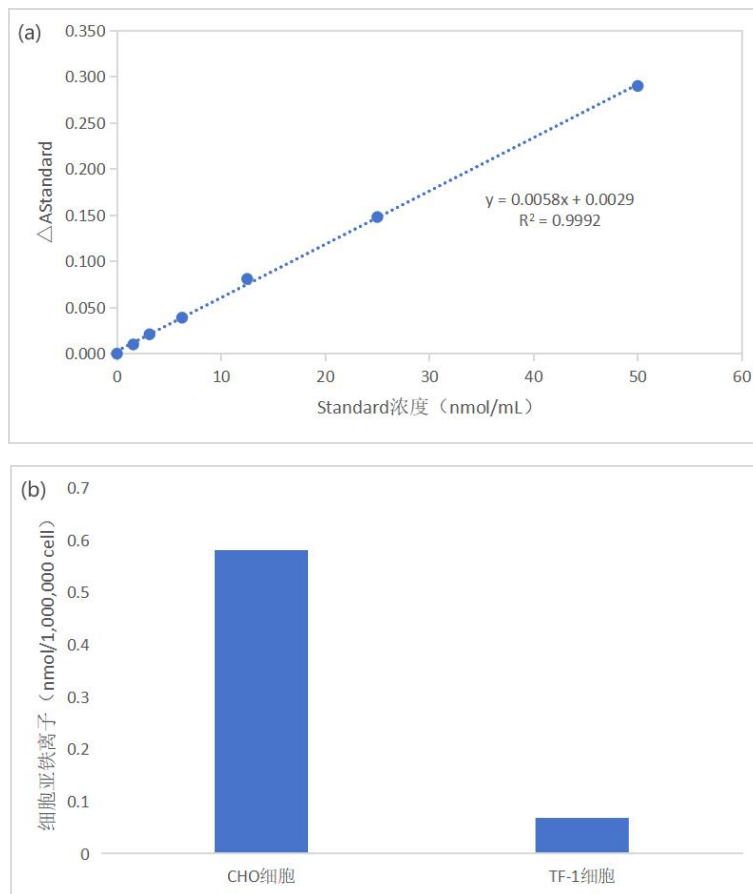


Figure 1. (a)细胞亚铁离子标准曲线。(b)本试剂盒测定 CHO 细胞和 TF-1 细胞中亚铁离子的含量。

相关产品

Catalog No.	Product Name
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）

免责声明

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。