

非血红素铁检测试剂盒(红菲咯啉微板法)

产品货号: BA2037

产品规格: 60T/300T

产品简介:

铁是人体必需的微量元素之一,也是人体中含量最多的微量元素。铁离子通常以三价铁形式与转铁蛋白结合,通过转铁蛋白通道进入细胞,被金属还原酶STEAP3还原成二价铁后,参与后续多种生理和生化过程。机体内铁元素的缺乏会引发各种缺铁性疾病,如贫血、免疫力低下等,此外还会导致消化不良、记忆力低下等消化系统和神经系统疾病。然而,尽管铁元素对于机体如此重要,却不是越多越好的。

进入细胞的铁被还原成亚铁离子后,会优先形成各种铁结合复合物,参与到各项生理和生化反应中去。当这些复合物含量接近饱和时,多余的二价铁会在细胞中积累,形成不稳定铁池。铁池中游离的二价铁参与芬顿反应,生成以羟基自由基为代表的活性氧(ROS)物质,积累的ROS将膜脂过氧化,从而造成细胞功能丧失和细胞死亡。这是细胞铁死亡的经典调控途径之一。

动物组织或细胞提取物中非血红素铁含量的多少,反应出细胞或组织贮存铁含量的变化。非血红素铁含量的测定可避免总铁含量测定中样品内血红素铁的影响。

非血红素铁检测试剂盒与总铁测定方法相似,但样品须经酸和热处理,经离心后非血红素铁释放到上清液中,而含血红素铁的蛋白则留在沉淀中。其测定原理是动物组织或细胞经组织消化液在酸性加热条件处理后,经离心可分离出血红素铁和非血红素铁,非血红素铁再被还原剂还原为二价铁后与红菲咯啉生成红色化合物,在500~550nm有强吸收,可通过酶标仪或分光光度计测定。该试剂仅用于科研领域,不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

产品组成	60T	300T	保存条件
试剂(A): 铁标准储液(100 μ g/ml)	1ml	5ml	2-8 $^{\circ}$ C
试剂(B): 组织消化液	100ml	500ml	室温, 避光
试剂(C1): 菲咯啉溶液	3.6ml	18ml	2-8 $^{\circ}$ C, 避光
试剂(C2): TGA溶液	3.6ml	18ml	2-8 $^{\circ}$ C, 避光
试剂(C3): 乙酸钠溶液	6ml	30ml	室温

自备材料:

1. 蒸馏水或PBS、酶标仪、96孔板、恒温箱或水浴锅
2. 精密天平、离心管、剪刀、震荡器或摇床、离心机、试管、匀浆器

操作步骤:(仅供参考)

1. 1.5ml离心管称重。称取100mg左右的组织,放入已称重的离心管中,再次称重。两次相减得到组织净重。
2. 制备样品消化液:向离心管中加入组织消化液1ml,65 $^{\circ}$ C消化不少于50h,中间用震荡器震荡3~5次,每次不少于10min,确保组织完全消化。用组织消化液定容至1.5ml,10000rpm离心5min,将管壁及盖子上的液体甩下,将上清液转移至新离心管,并定容至1.5ml,混合备用。
3. 细胞样品的匀浆和消化:培养细胞经过消化并计数 $0.5\sim 1\times 10^6$ /ml,加入等体积的蒸馏水或PB匀浆,匀浆液与组织消化液按1:5比例混合,90 $^{\circ}$ C消化30min,确保细胞完全消化。冷却后10000rpm离心5min,将管壁及盖子上的液体甩下,将上清液转移至新离心管,备用。
4. 配制铁显色工作液:将菲咯啉溶液(试剂C1)、TGA溶液(试剂C2)、乙酸钠溶液(试剂C3)按照3:3:5配



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话:400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzybio@126.com

比得到铁显色工作液，需现配现用。

5. 配制系列铁标准液：将铁标准储液(100 $\mu\text{g/ml}$)用蒸馏水稀释至20 $\mu\text{g/ml}$ ，再按下表进行操作，依次稀释。

加入物(ml)	1	2	3	4	5
铁标准储液(20 $\mu\text{g/ml}$)	0.1	0.25	0.5	0.75	1
蒸馏水	0.9	0.75	0.5	0.25	0
相当于铁浓度($\mu\text{g/ml}$)	2	5	10	15	20

6. 加样：取一个无铁污染的干净酶标板(或96孔板)按照下表设置空白管、标准管、测定管，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡。如果样品中的铁含量过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置2平行管，求平均值。

加入物(μl)	空白管1	空白管2	标准管	测定管
蒸馏水	10	-	-	-
组织消化液	-	10	-	-
系列铁标准(1~5号)	-	-	10	-
待测样品	-	-	-	10
铁显色工作液	200	200	200	200

7. 测定：充分混匀，室温显色10min。以空白管1调零，以酶标仪在505~550nm处测定空白管2、系列标准管、测定管的吸光度，分别记为A空白2、A标准、A测定。

计算：

以系列铁标准(1~5号)(2、5、10、15、20 $\mu\text{g/ml}$)为横坐标，以对应的吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，求得回归方程，以测定孔的吸光度代入回归方程求得样品消化液中的铁浓度，亦可不做标准梯度，直接进行单标准比色测定，一般选择5或者10 $\mu\text{g/ml}$ 的铁标准。

组织铁含量($\mu\text{g/g}$)=C测定 \times V/w= A测定/A标准 \times V/w \times C标准

细胞铁含量($\mu\text{g/百万}$)=C测定 \times V \times (n/10⁶)= A测定/A标准 \times V \times C标准 \times n/10⁶

式中：C测定=经标曲计算得出的样品消化液中的铁浓度($\mu\text{g/ml}$)；

V=样品消化液的总体积；

w=组织重量(g)；

C标准=铁标准浓度=5或10($\mu\text{g/ml}$)；

n=细胞数量。

注意事项：

- 操作中的手术器械、枪头、容器、96孔板等，一定保证干燥且干净，避免铁污染。
- 组织非血红素铁差异较小，一定每个组织和管子都称重，国产管子的重量相差很多。
- 试剂盒是否过期验证：取10 μl 铁标准储液(100 $\mu\text{g/ml}$)加入200 μl 铁显色工作液，看是否显色为深红色，如是，则试剂没过期，可继续使用。
- 试剂有效性判读：用空白管1作对照调零，如空白管2读数 <0.004 说明没有污染可以使用，如果空白管2读数 >0.004 ，说明组织消化液有污染。
- 组织消化液有强酸性和腐蚀性，请小心操作。
- 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件：2-8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期6个月。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com