北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www. bjoka- vip. com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

非血红素铁检测试剂盒（ 红菲咯啉微板法 ）

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，却也不是越多越好的。

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:

编号 / 名称	GCTC1000 60T	GCTC1000 300T	Storage
试剂（A）：铁标准储液（100μg/ml）	1ml	5ml	4℃
试剂（B）：组织消化液	100ml	500ml	RT 避光
试剂（C1）：菲啰啉溶液	3.6ml	18ml	4℃ 避光
试剂（C2）： TGA 溶液	3.6ml	18ml	4℃ 避光
试剂（C3）：乙酸钠溶液	6ml	30ml	RT
使用说明书	1 份		

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℃ 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 0.5~1×10^6ml ，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℃ 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：将菲啰啉溶液（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（100μg/ml）用蒸馏水稀释至 20μg/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（20μg/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（μg/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 、 20μg/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 10μg/ml 的铁标准。

组织铁含量（μg/g)=$C_{测定}$×V/w= $A_{测定}$/ $A_{标准}$×V/w×$C_{标准}$

细胞铁含量（μg/ 百万)=$C_{测定}$×V×(n/10^6)= $A_{测定}$/ $A_{标准}$×V×$C_{标准}$×n/10^6

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

n= 细胞数量。

注意事项:

1 、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。

2 、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。

3 、试剂盒是否过期验证：取 10ul 铁标准储液（100μg/ml）加入 200ul 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。

4 、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。

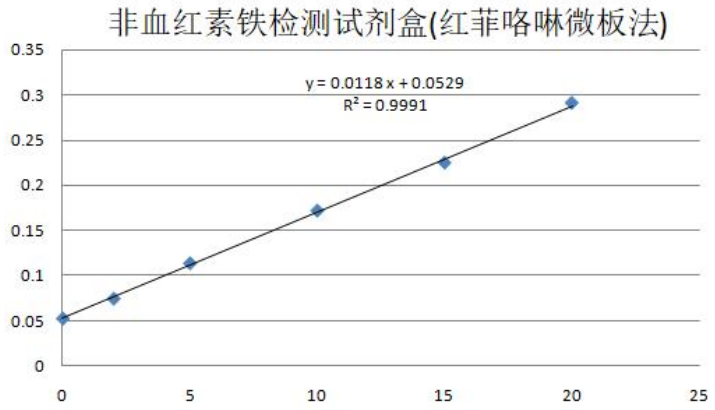
5 、组织消化液有强酸性和腐蚀性，请小心操作。

6 、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

7 、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期： 6 个月有效，低温运输，按要求保存。

附录： 标准曲线制作：在室温条件下按说明书操作，用酶标仪对系列标准进行吸光度的测定，其标准曲线如下（ 仅供参考 ）：



相关产品:

产品编号	产品名称
GCCS0001	ACK 红细胞裂解液（ACK Lysis Buffer)
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDF0135	组织细胞固定液（4% PFA)
GCDH0059	Scott 蓝化液
GCDH0085	酸性乙醇分化液（1%)
GCDP0013	GUS 染色液（ 即用型 ）
GCDZ2011	环保浸蜡脱蜡透明液
GCPE0103	Acr-Bis(30%,29:1)
GCPW0082	丽春红 S 染色液（1×Ponceau S)
GCTC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒（DNS 比色法 ）
GCTO1013	丙二醛（MDA）检测试剂盒（TBA 比色法 ）

