

组织铁 (Fe) 测定试剂盒

(货号: BC058 比色法 50 管/48 样)

一、试剂的组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

一号试剂:100mg/L 铁标准贮备液: 1mL×1 支, 4°C 保存。临用时取铁标准贮备液 0.1mL 加双蒸水 4.9mL(即 50 倍稀释),现用现配。

二号试剂: 二号甲粉×1 支, 二号乙粉×1 支, 二号丙液 100mL×1 瓶, 4°C 保存。使用时将二号甲粉、二号乙粉倒入 100mL 二号丙液中, 充分混匀, 溶解完全, 配成**铁显色剂**, 4°C 避光保存。

二、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及比色皿 (或酶标仪 (520nm) 及 96 孔板), 95°C 沸水浴锅, 涡旋混匀器, 离心机, 双蒸水或去离子水。

三、操作步骤:

1、样本前处理:

动物组织的样本前处理: 准确称取待测动物组织的重量, 按重量 (g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件机械匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。

细胞样本前处理: (贴壁细胞) 用细胞刮配合等渗 PBS 刮下或用胰酶消化下来 (消化后加入 0.5-1mL 等渗 PBS 冲洗), 再将细胞悬液转移到另一离心管中, 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀; 用等渗缓冲液 (推荐 0.1mol/L、pH7~7.4 磷酸盐缓冲液) 清洗 1~2 次, 同样 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀 (若不立即测定, 可直接放 -20°C 或 -80°C 冰箱保存, 3 个月内可用); 往细胞沉淀中加入 0.2~0.3mL 的匀浆介质 (推荐 0.1mol/L pH7~7.4 的 PBS 或生理盐水) (**加完匀浆介质后轻轻混匀细胞溶液, 使其均匀, 吸取少量进行细胞计数; 若是破碎后可以测蛋白, 则不用细胞计数**), 冰水浴条件下超声破碎(功率:300W,3~5 秒/次,间隔 30 秒, 重复 3~5 次) 或手动匀浆, 制备好的匀浆液若比较均匀可不离心直接测定。也可采用裂解液裂解(推荐 TritonX-100, 1~2%,裂解 30~40 分钟),裂解好的液体可不离心直接测定。[注]: **建议细胞数在 100 万个以上 (越多测定效果越好)。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全。**

植物组织的样本前处理: 准确称取待测植物组织的重量, 按重量 (g) :体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的匀浆介质 (匀浆介质推荐使用 0.1mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液), 冰水浴条件下机械匀浆, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。

2、操作表:

	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (mL)	0.5		
2mg/L 铁标准应用液 (mL)		0.5	
待测样本 (mL)			0.5

铁显色剂 (mL)	1.5	1.5	1.5
混匀后, 95°C以上沸水浴 5 分钟, 冷却后, 3500 转/分钟, 离心 10 分钟, 取上清液 1.0mL, 0.5 或 1cm 光径, 波长 520nm, 双蒸水调零, 分光光度计测各管吸光度值 A (或每管取 200μL 酶标仪 520nm 处读数)。			

四、计算与举例:

1、计算公式:

$$\begin{aligned} \text{组织中 铁含量} &= \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \text{Cpr} \\ (\text{mg } (\mu\text{mol}) / \text{gprot}) & \\ \text{组织中 铁含量} &= \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}} \\ (\text{mg } (\mu\text{mol}) / \text{g组织}) & \\ \text{细胞中 铁含量} &= \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{\text{细胞数}}{V_{\text{样总}}} \\ (\text{mg } (\mu\text{mol}) / 10^4 \text{ 个细胞}) & \\ C_{\text{标准}} &: \text{标准品浓度, } 2\text{mg/L (或 } 35.81\mu\text{mol/L)}; \\ \text{Cpr} &: \text{组织匀浆蛋白浓度, gprot/L (prot 指蛋白)}; \\ \text{细胞数} &: \text{细胞破碎时的细胞总数, 万个}; \\ W &: \text{组织样本质量, g}; \\ V_{\text{样总}} &: \text{样本前处理时加入的匀浆介质的总体积, L}。 \end{aligned}$$

注:标准液铁浓度为 2000μg/L,铁原子量为 55.847,所以标准管铁含量为 35.81μmol/L。

注:细胞样本计算时,也可用组织第一种计算公式。

2、计算举例:

例 1: 取 10%的小鼠肝组织匀浆 0.5mL 按操作表进行测定, 在 520nm 处, 0.5cm 光径, 测得各管吸光度为: 空白管 0.002, 标准管 0.064, 测定管 0.235, 同时测得 10%小鼠肝匀浆蛋白浓度为 13.1365 gprot/L, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{组织铁含量} &= \frac{0.237 - 0.002}{0.064 - 0.002} \times 35.81 \div 13.1365 \\ (\mu\text{mol/gprot}) & \\ &= 10.3324 \mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

例 2: 取 10%小鼠肾组织匀浆 0.5mL 按操作表进行测定, 在 520nm 处, 0.5cm 光径, 测得各管吸光度为: 空白管 0.002, 标准管 0.064, 测定管 0.079, 同时测得 10%小鼠肾匀浆蛋白浓度为 10.5776gprot/L, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{组织铁含量} &= \frac{0.079 - 0.002}{0.064 - 0.002} \times 35.81 \div 10.5776 \\ (\mu\text{mol/gprot}) & \\ &= 4.2045 \mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

例 3: 取 10%小鼠心肌组织匀浆 0.5mL 按操作表进行测定, 在 520nm 处, 0.5cm 光径, 测得各管吸光度为: 空白管 0.002, 标准管 0.064, 测定管 0.078, 同时测得 10%小鼠心肌匀浆蛋白浓度为 6.6536gprot/L, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{组织铁含量} &= \frac{0.078 - 0.002}{0.064 - 0.002} \times 35.81 \div 6.6536 \\ (\mu\text{mol/gprot}) & \\ &= 6.5974 \mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

例 4: 取 10%小鼠肺组织匀浆 0.5mL 按操作表进行测定, 在 520nm 处, 0.5cm 光径, 测得各管吸光度为: 空白管 0.002, 标准管 0.064, 测定管 0.094, 同时测得 10%小鼠肺匀浆蛋白浓度为 7.1655gprot/L, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{组织铁含量} &= \frac{0.094 - 0.002}{0.064 - 0.002} \times 35.81 \div 7.1655 \\ (\mu\text{mol/gprot}) &= 7.4157 \mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

例 5: 取 10%小鼠脑组织匀浆 0.5mL 按操作表进行测定, 在 520nm 处, 0.5cm 光径, 测得各管吸光度为: 空白管 0.002, 标准管 0.064, 测定管 0.040, 同时测得 10%小鼠脑匀浆蛋白浓度为 4.4358gprot/L, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{组织铁含量} &= \frac{0.040 - 0.002}{0.064 - 0.002} \times 35.81 \div 4.4358 \\ (\mu\text{mol/gprot}) &= 4.9479 \mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

例 6: 取 5%菠菜叶片组织匀浆 0.5mL 按操作表进行测定, 在 520nm 处, 0.5cm 光径, 测得各管吸光度为: 空白管 0.002, 标准管 0.064, 测定管 0.053, 同时测得 5%菠菜叶片匀浆蛋白浓度为 1.6378gprot/L, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{组织铁含量} &= \frac{0.053 - 0.002}{0.064 - 0.002} \times 35.81 \div 1.6378 \\ (\mu\text{mol/gprot}) &= 17.9855 \mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

五、注意点:

- 1、若用玻璃器材, 需严格清洗, 避免铁的污染, 建议最好用一次性塑料试管或离心管。
- 2、若上清浑浊, 可加大离心转速或加入 0.2mL 氯仿涡旋充分混匀再离心后比色。
- 3、本法测定效果好, 干扰因素少, 适用于多种样本的测定。
- 4、本法在反应完后, 可吸取显色后上清液 0.2mL 加入 96 孔板 (注意不要吸入气泡), 用酶标仪 520nm 处读数, 计算公式不变。
- 5、样本中铁含量过低, 可以调整样本的用量 (增加样本量, 显色液量不变, 空白管双蒸水、标准管标准液量同时增加)。

六、测定原理:

在酸性溶液和还原剂的作用下, 使运铁蛋白中铁与蛋白分离, 使组织中的高铁还原成亚铁, 后者与双吡啶结合成粉红色的络合物, 在一定范围内, 铁离子的多少与呈色深浅成正比关系。

附录 I：铁标准曲线

一、前处理：

不同浓度铁标准液制备：取 100mg/L 铁标准贮备液用双蒸水稀释成以下浓度待测：
0mg/L、0.5mg/L、1mg/L、2mg/L、5mg/L、10mg/L、20mg/L、50mg/L。

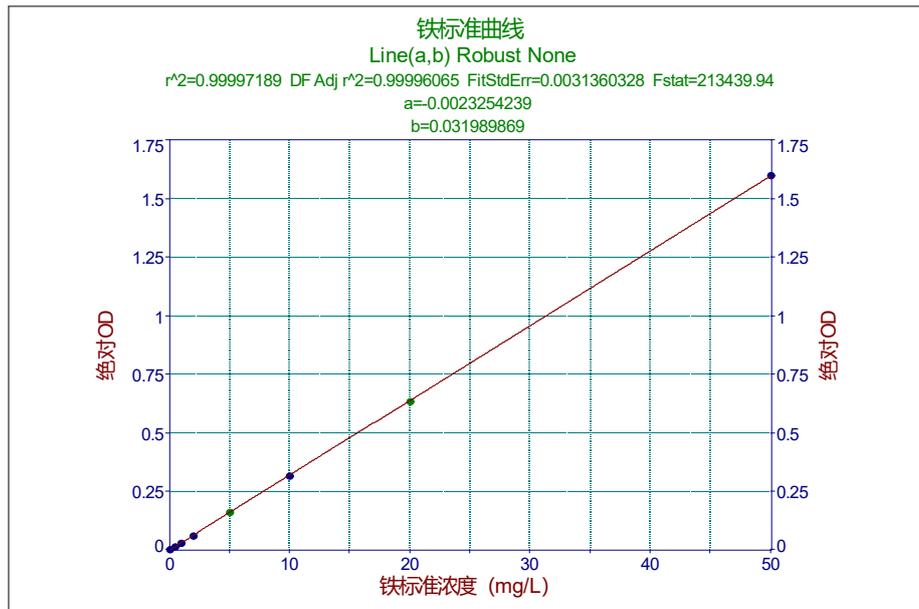
二、操作表：

管号	1	2	3	4	5	6	7	8
铁标准液浓度 (mg/L)	0	0.5	1.0	2.0	5.0	10	20	50
铁标准液取样量(mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
铁显色剂(mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

混匀，95℃以上沸水浴 5 分钟，流水冷却，0.5 或 1cm 光径（与样本测定时相同），波长 520nm，双蒸水调零，分光光度计测各管吸光度值 A（或每管取 200μL 酶标仪 520nm 处读数）。

三、检测结果：

管号	铁标准浓度 (mg/L)	测定 OD	绝对 OD
1	0	0.003	0.000
2	0.5	0.018	0.015
3	1	0.032	0.029
4	2	0.062	0.059
5	5	0.165	0.162
6	10	0.320	0.317
7	20	0.636	0.633
8	50	1.602	1.599



标准曲线用户如果不做，按第 1 页的操作表操作后用计算公式计算即可。