

细胞总铁含量（亚铁嗉比色法）

< 编号： ml300819 微量法 100 管/96 样 >

注 意：正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

铁是人体必须的微量元素之一，也是血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素及其他酶系统的主要成分，在氧的运输和脂肪氧化过程中起着重要作用，铁元素缺乏易造成贫血、代谢紊乱并影响机体免疫功能。

测定原理：

在酸性介质中铁从复合物中解离出来，再被还原剂还原成二价铁，并与亚铁嗉生成紫红色化合物，该有色物质在 562nm 处有特征吸收峰，进而计算得出总铁含量。

自备仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、离心机、蒸馏水。

试剂清单：

试剂名称	规格	数目	贮藏	
试剂一	液体 25mL	x1	4°C	
试剂二	液体 23mL	x1	4°C, 避光	
试剂三	粉剂	x2	4°C, 避光	
试剂四	液体 2mL	x1	4°C, 避光	
标准品储备液	液体 1mL	x1	4°C, 避光	1mmol/L 铁标准溶液

样品提取 (按照步骤依次操作):

一、细胞样本

- 1、先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；
- 2、取约 1×10^6 细胞加入 0.2mL 试剂一，混匀后放置在冰盒上裂解 10min；
- 3、然后离心 10min (12000rpm 4°C)，取上清，置冰上待测。

实验准备:

- 1、酶标仪预热 30min 以上，设定波长至 562nm；
- 2、试剂三的制备^①：每支加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用；
- 3、标准品的配制：将 标准品储备液 用 试剂四 稀释 50 倍，即为 20 μ mol/L 标准品；

试剂名称 (μ L)	标准品 (500 μ L)
标准品储备液	10
试剂四	490
混匀，即为标准品	

- 4、所有试剂解冻至室温；

测定操作:

试剂名称 (μ L)	测定管	空白管 (只做一管)	标准管 (只做一管)
样本	40	-	-
蒸馏水	-	40	-
标准品	-	-	40
试剂二	150	150	150
试剂三	20	20	20
加入 96 孔板中，充分混匀，室温放置 15min 于 562nm 测定吸光值 A			

^① 微量粉剂 使用前甩几下(或离心) 使粉体落入底部后 小心开盖。

结果计算:

(1) 按细胞数量计算:

$$\begin{aligned}\text{细胞铁含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= [(A \text{ 测定}-A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准}-A \text{ 空白}) \times C] \div (N \div V \times 1) \times D \\ &= 4 \times (\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div N \times D\end{aligned}$$

(2) 按照蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{细胞铁含量}(\text{nmol}/\text{mg prot}) &= [(A \text{ 测定}-A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准}-A \text{ 空白}) \times C] \div (\text{Cpr} \times 1) \times D \\ &= 20 \times (\Delta A_{\text{样}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div \text{Cpr} \times D\end{aligned}$$

C 标准: 铁标品浓度, 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$;

V: 细胞处理时试剂一加入的量, 0.2mL;

N: 加入细胞数量, 100 万 cell;

D: 额外稀释倍数, 未稀释即为 1

1: $\mu\text{mol}/\text{L}$ 到 nmol/mL 换算系数

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL

预实验的意义:

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达处理的样本);
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;
- 5、通过 3 - 5 组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。