

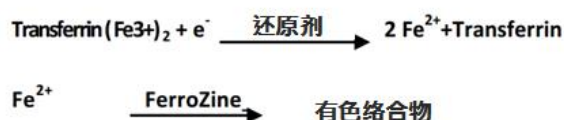
铁离子比色法检测试剂盒(Intracellular Iron Colorimetric Assay Kit)

E1042

描述: 铁是人体必需的元素之一, 对人体的新陈代谢和身体健康具有重要作用, 血液中铁的含量不足, 就会造成缺铁性贫血。铁存在于人体所有的细胞内, 各组织、器官包括各内分泌腺都含有铁。肝脏、脾脏和肺组织内含量较为丰富。成人体内含铁 3~5 克, 大部分都以蛋白质复合物形式存在, 极少部分以离子的形态存在。本试剂盒采用亚铁嗪比色法可以定量细胞铁离子, 线性范围 5~300uM。产品包括标准品和空白对照。

原理:

铁与蛋白结合成复合物, 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, 并与亚铁嗪生成紫红色化合物, 在 540-580nm 处可比色测定。其反应如下图所示:



组成:

1. 细胞裂解液: 20 ml
2. 缓冲液: 5ml
3. 检测剂: 3ml
4. 标准品: 1ml
5. 稀释用液: 20ml

储存: 4℃保存, 6个月有效。

适用范围: 该试剂盒可用于培养细胞中铁离子定量检测。

用户自备: 4.5%高锰酸钾溶液 5ml (4.5%为质量体积比)。

操作步骤:

1. 样品准备 (以 2×10^6 细胞数为例):

收集细胞, 然后用预冷的 PBS 洗两遍, 将 PBS 吸弃, 加入 100-200ul 裂解液, 剧烈震荡或涡旋 20-30S, 置于摇床裂解 2h, 12000rpm 5min 取上清进行后续铁离子浓度测定和蛋白浓度测定。

注意: 摇床裂解后, 如果样本粘稠, 请使用超声破碎仪超声, 12000rpm 5min 取上清。

2. 标准品的稀释: 用试剂盒提供的稀释用液将 3mM 的标准品母液稀释为: 300 uM、150uM、75uM、37.5uM、18.75uM、9.38uM、4.69uM。注意倍比稀释并设置 0 浓度对照反应管。

3. 将缓冲液与 4.5%高锰酸钾溶液按 1:1 混匀, 称为混液 A。
4. 参考下表, 设置空白对照管、标准品管和样品管。如果样品中的铁元素含量过高, 用裂解液适当稀释后再进行测定。

	空白对照	稀释后的标准品	裂解的样品
稀释用液	100 μ l	—	
混液 A	100 μ l	100 μ l	100 μ l
样品	—	—	100 μ l
标准品工作液	—	100 μ l	—

5. 混匀, 60 $^{\circ}$ C 孵育 1h。
6. 冷却至室温, 将管盖与管壁上的液滴离心入管底。
7. 加入 30 μ l 铁离子检测剂, 混匀, 室温孵育 30min, 12000rpm 5min 取上清。
温馨提示: 如果样本中出现络合物请先震荡混匀, 12000rpm 5min 取上清
8. 取 200 μ l 或适当体积 于 96 孔板, 在 550nm 测定吸光度。如果不能测定 550nm, 也可以在 540nm~580nm 范围内检测。
9. 绘制标准曲线并计算铁离子浓度。
10. 建议用 BCA 方法 (货号 P1511) 测定步骤 1 中样本上清中的蛋白浓度, 进行铁离子浓度校正。

说明:

1. 本试剂盒不受锰离子、镁离子、镍离子和锌离子等的干扰。
2. 操作过程中, 样品与试剂等避免与铁器接触, 以防污染。
3. 所测样本的值高于标准曲线的上限, 应稀释样品后重新测定。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作, 检测试剂有腐蚀性, 请小心操作, 若不慎沾到皮肤上请马上用清水冲洗干净。
5. 该试剂盒仅供科学研究使用。