

## 铁离子与亚铁离子检测试剂盒(显色法)

产品编号	产品名称	包装
S1066S	铁离子与亚铁离子检测试剂盒(显色法)	100次
S1066M	铁离子与亚铁离子检测试剂盒(显色法)	500次

### 产品简介:

- 碧云天的铁离子与亚铁离子检测试剂盒(显色法) (Ferric and Ferrous Ion Assay Kit, Colorimetric), 又称Ferrous Ion Assay Kit、Iron Ion Assay Kit、Iron Test Kit、铁离子含量检测试剂盒、总铁离子检测试剂盒或铁离子检测试剂盒, 是一种利用吸光度检测方法, 快速、高灵敏地对血清、血浆、组织、细胞以及组织裂解液样品中总铁离子、三价铁离子(高铁)或二价铁(亚铁)离子含量进行高灵敏度检测的试剂盒。
- 铁(Iron)是人体中丰度较高的必需微量元素之一[1], 通常以两种生物学相关状态存在, 即还原态的二价铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ , Ferrous Ions), 也称亚铁离子, 和氧化态的三价铁离子( $\text{Fe}^{3+}$ , Ferric Ions), 两种状态间氧化还原循环的平衡有助于铁作为酶和蛋白质分子等活性所需的辅助因子, 以维持酶和蛋白质等正常生物学功能[2]。此外, 铁是人体蛋白质合成重要原料, 含铁蛋白质是细胞和机体功能所必需的, 如氧气运输、核酸复制和修复、线粒体呼吸、宿主防御等[3]。因此, 铁对于生物体的生存至关重要。当铁含量过低或过高时均会损害机体, 从而导致疾病的产生。铁含量过低时, 人体可能会出现缺铁性贫血、异食癖等; 铁含量过高时, 人体可能会出现急性或慢性铁中毒, 损害多个器官等[4]。因此, 检测铁离子含量对于防治铁相关疾病具有重要意义。
- 检测溶液中亚铁离子含量的方法有硫氰化钾法、硝酸银法、铁氰化钾法等, 其中硫氰化钾法和硝酸银法对亚铁离子检测灵敏性低、干扰因素多; 铁氰化钾法中铁氰化钾有毒性, 在强酸条件下会产生剧毒气体氰化氢。本试剂盒采用探针法, 该探针(Iron Probe)是一种无味、无毒的用于高灵敏检测溶液中亚铁离子含量。Iron Probe可与亚铁形成紫色络合物, 该络合物在593nm处有强吸收峰, 可以利用吸光度进行检测。
- 本试剂盒的检测原理请参考图1。在酸性条件下, 铁从复合物中(如Transferrin)解离出来, 然后使用还原剂(Reduction Buffer)将三价铁离子还原为亚铁离子。Iron Probe与亚铁离子形成紫色络合物, 通过酶标仪检测593nm处吸光度, 再使用本试剂盒提供的Iron Standard, 通过设置标准曲线计算出样品中总铁含量。如需检测样品中亚铁离子含量, 则直接加入Iron Probe, 而无须加入Reduction Buffer, 通过酶标仪检测593nm处的吸光度, 再通过标准曲线计算就可获得样品中亚铁离子含量。最后通过总铁离子与亚铁离子含量的差值就能间接计算出三价铁离子含量。

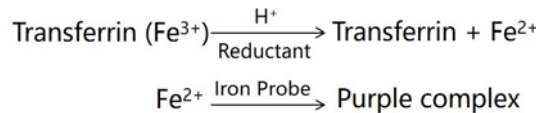


图1. 碧云天铁离子与亚铁离子检测试剂盒(显色法) (S1066)检测原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽。本试剂盒在标准品体积为100 $\mu\text{l}$ 时, 可以检测浓度低至0.8 $\mu\text{M}$ 的铁离子, 在0.8-50 $\mu\text{M}$  (0.08-5nmol), 即约0.044-2.8mg/L (Fe)浓度范围内有良好的线性关系。本试剂盒提供了Iron Standard标准溶液, 可以通过绘制标准曲线(图2), 计算出样品中的铁离子含量。

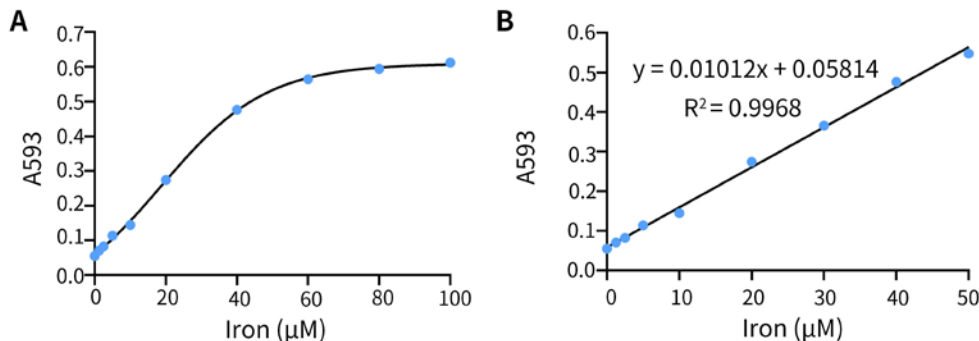


图2. 碧云天铁离子与亚铁离子检测试剂盒(显色法) (S1066)用于标准品检测的效果。取100 $\mu\text{l}$ 用Assay Buffer稀释的各浓度的Iron Standard与20 $\mu\text{l}$ 的Reduction Buffer混匀后, 加入5 $\mu\text{l}$  Decontamination Solution, 并用Assay Buffer补齐至190 $\mu\text{l}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应30分钟。再加入10 $\mu\text{l}$  Iron Probe混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应30分钟, 然后进行吸光度检测。图A为0-100 $\mu\text{M}$ 的标准曲线, 图B为0-50 $\mu\text{M}$ 的标准曲线, 在0.8-50 $\mu\text{M}$  (约0.044-2.8mg/L)浓度范围内有良好的线性关系。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。**使用本试剂盒中的BeyoLysis™ Buffer H for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品，也可以用于碧云天生产的其它代谢类试剂盒中同样使用BeyoLysis™ Buffer H for Metabolic Assay进行裂解的样品检测，通用性强；而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。
- **本试剂盒特异性高，应用范围广，检测速度快。**本试剂盒经过优化，可有效屏蔽常见金属离子如Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>等的干扰，而且本试剂盒提供Decontamination Solution，可有效消除含脂质较多的组织样品出现的白色浑浊物。本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆等生物体液，细胞培养上清、组织或细胞样品等的检测。本试剂盒不仅适合少量样品的检测，也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。整个检测过程约1个小时即可完成。本试剂盒用于血清、动物组织及细胞样品中铁离子的检测效果请参见图3和图4。

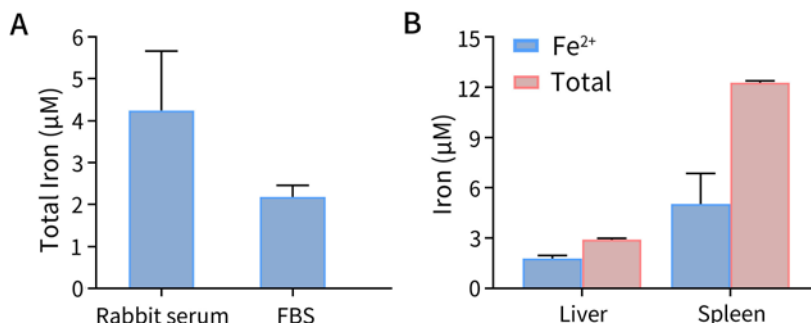


图3. 碧云天铁离子与亚铁离子检测试剂盒(显色法) (S1066)用于不同血液或组织样品中铁离子浓度的检测效果图。图A为兔血清(Rabbit serum)、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)总铁离子浓度检测，图B为小鼠肝脏(Liver)和脾脏(Spleen)样品中总铁离子及亚铁离子浓度的检测效果图。对于总铁离子的检测，取50µl样品和20µl的Reduction Buffer混匀后，加入5µl Decontamination Solution，并加入Assay Buffer补齐至190µl，37°C避光反应30分钟，直至样品孔中液体清澈透亮。再加入10µl Iron Probe混匀，37°C避光反应30分钟，随后进行吸光度检测可获得总铁OD值，根据标准曲线计算出样品总铁浓度。对于亚铁检测则上述步骤无需加入Reduction Buffer。如需获得样品中三价铁含量，使用总铁离子与亚铁离子浓度的差值就能间接计算出三价铁离子浓度。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

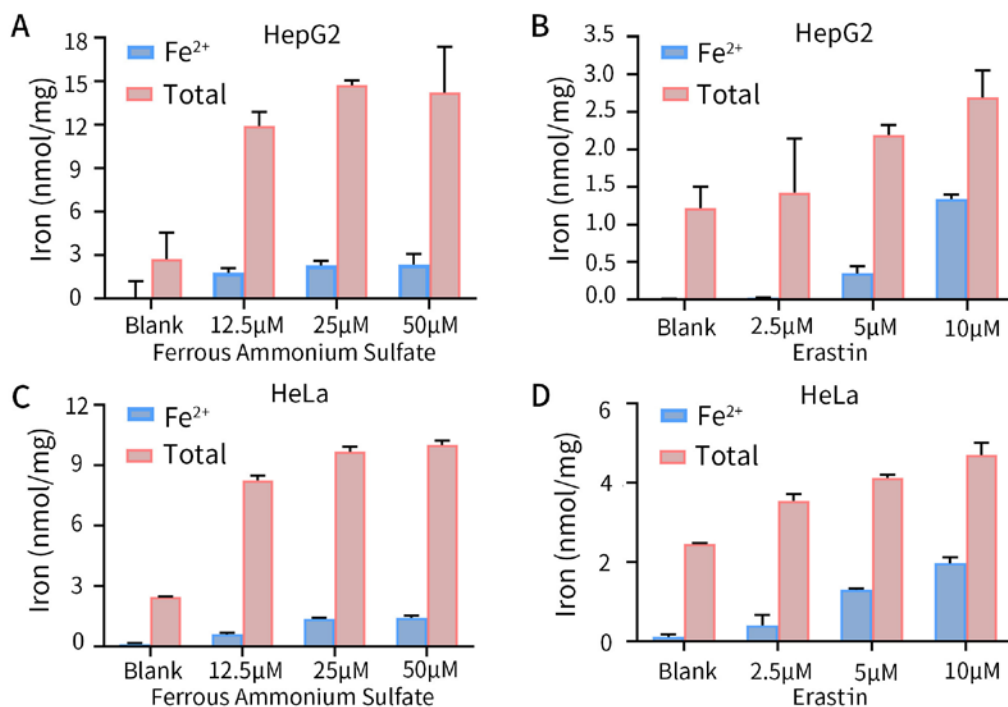


图4. 碧云天铁离子与亚铁离子检测试剂盒(显色法) (S1066)用于不同细胞样品中铁离子浓度的检测效果图。图A和图C分别为HepG2和HeLa细胞培养液中添加不同浓度硫酸亚铁铵(Ferrous Ammonium Sulfate)培养24小时后，细胞内铁离子浓度的检测；图B和图D分别为HepG2和HeLa细胞培养液中添加不同浓度的Erastin (Ferroptosis诱导剂) (SC0224)，诱导培养48小时后，细胞内铁离子浓度的检测。总铁离子和亚铁检测方法同图3，细胞样品为100µl细胞裂解液(约100万个细胞)使用本试剂盒进行检测。图中的浓度为nmol铁离子/毫克蛋白。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- 按照使用说明操作，本试剂盒小包装可以进行100次检测，中包装可以进行500次检测。

**包装清单：**

产品编号	产品名称	包装
S1066S-1	BeyoLysis™ Buffer H for Metabolic Assay	20ml

S1066S-2	Assay Buffer	20ml
S1066S-3	Reduction Buffer	2ml
S1066S-4	Decontamination Solution	600µl
S1066S-5	Iron Standard (50mM)	50µl
S1066S-6	Iron Probe	1ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S1066M-1	BeyoLysis™ Buffer H for Metabolic Assay	100ml
S1066M-2	Assay Buffer	100ml
S1066M-3	Reduction Buffer	10ml
S1066M-4	Decontamination Solution	3ml
S1066M-5	Iron Standard (50mM)	250µl
S1066M-6	Iron Probe	5ml
—	说明书	1份

### 保存条件：

-20°C保存，一年有效。Iron Standard (50mM)和Iron Probe须避光保存。

### 注意事项：

- 需自备1M盐酸。
- 对于未知铁离子浓度样品的检测，建议设置一系列稀释梯度，以确保读数在标准曲线范围内。
- 须设置空白对照组以排除样品本身的颜色带来的影响。
- 本试剂盒检测时涉及氧化还原反应，因此所有氧化剂或还原剂都会干扰本试剂盒的测定。
- 本试剂盒最终反应体系的pH值约4.5。请确保样品的pH值接近中性，过酸或过碱都会影响试剂盒的检测。如果发现异常，请检测一下反应体系的最终pH值是否在4.5左右，过高或过低都可以视为异常，此时需要调整样品的pH值接近中性。
- 请确保样品和使用到的试剂中均不能含有EDTA等螯合剂，EDTA会干扰铁离子的检测。
- 由于一些细胞中Fe<sup>2+</sup>含量非常低，且Fe<sup>2+</sup>在检测过程中可能逐渐被氧化为Fe<sup>3+</sup>，导致Fe<sup>2+</sup>不能被检测到，甚至为负值。建议适当提高细胞的数量，并且尽量减少样品暴露在空气中的时间，尽快进行测定。
- 涉及的所有的实验器皿不能含有铁。对于血液样品需确保在样品收集过程中无溶血发生。
- 经测试，本试剂盒相对稳定，检测所得的Iron标准曲线的线性范围等通常和说明书中的描述一致，但是实际效果可能会因为实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，例如最高浓度点的数据偏低或不在线性范围内等，通常可以舍去高浓度异常点的数据，取在线性范围内的数据来拟合标准曲线。
- 血清、血浆等样品如在4°C保存，保存的时间不得超过一周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品在-20°C保存，-80°C保存更佳。
- 酶标仪检测时须使用适合显色法检测的透明孔板，推荐选购碧云天的BeyoGold™ 96孔细胞培养板(FCP962)或96孔板(平底，带盖)(FPT010/FPT011)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明：

#### 1. 样品的准备。

- 血液样品的准备：对于血清样品，将全血在常温如25°C下放置30分钟-2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素进行抗凝(不可使用EDTA或柠檬酸盐抗凝剂，会干扰铁离子的检测)，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20°C或-80°C。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。
- 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体，并使用胰酶进行细胞消化(胰酶不能含有EDTA，推荐使用碧云天生产的C0205胰酶细胞消化液(0.25%胰酶，不含EDTA))。对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如100-500×g，5分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100-200µl BeyoLysis™ Buffer H for Metabolic Assay的比例加入裂解液，适当吹打，使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600/E6607)或玻璃匀浆器在约4°C或冰浴等低温条件下进行匀浆，然后冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。对于组织样品，按照每10mg组织加入100µl BeyoLysis™ Buffer H for Metabolic Assay的比例，使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600/E6607)或玻璃匀浆器在约4°C或冰浴等低温条件下进行匀浆。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4°C或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可-20°C或-80°C冻存。
- 如需按样品蛋白浓度计算铁离子含量，推荐使用碧云天BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型) (P0009/P0010)或BCA蛋白浓度测定

试剂盒(P0011/P0012)同时对上述裂解液进行蛋白浓度测定。

## 2. 样品酸处理。

将准备好的样品按照每100μl样品的体积加入5μl的1M盐酸，吹打混匀之后将样品置于60°C的水浴中孵育30分钟。随后4°C，12,000×g离心10分钟。取上清用于铁离子含量的检测。

## 3. 样品测定。

a. Iron标准曲线设置。取4μl的Iron Standard (50mM)，加入1.996ml的 Assay Buffer混匀，配制成浓度为100μM的Iron标准溶液。分别取100μM的Iron Standard溶液0、1.25、2.5、5、10、20、30、40、50μl加入96孔板的标准品孔中，并相应地用 Assay Buffer补足至100μl，此时，标准曲线的浓度分别为0、1.25、2.5、5、10、20、30、40、50μM。

注：吸光度检测时建议使用透明96孔板(FPT010/FPT011/FCP962)。

b. 参考下表，设置对照孔和样品孔，并按照下表依次加入样品和各溶液。加入待测样品后，混匀，37°C孵育30分钟。

Group	Blank Control	Standard Group	Sample (Fe <sup>2+</sup> )	Sample (Total)
Sample	0μl	100μl	10-100μl	10-100μl
Reduction Buffer	0μl	20μl	0μl	20μl
Decontamination Solution*	5μl	5μl	5μl	5μl
Assay Buffer	To 190μl			

注1：如需获取更加可靠的检测结果，推荐每个样品设置2-3个平行孔。

注2：\*(可选)对于含脂质较多的组织样品，可能会出现白色浑浊物，可通过添加5μl的Decontamination Solution来改善。如果不出现白色浑浊物，也可以不添加Decontamination Solution。如果样品不添加Decontamination Solution，空白对照和标准品也不添加Decontamination Solution。Decontamination Solution在-20°C保存后会结冻，可以37°C水浴孵育适当时间至完全溶解，随后混匀即可使用。

注3：如果仅计算样品中亚铁离子的含量，可以不设置Sample (Total)组；如果仅检测总铁离子含量，可以不设置Sample (Fe<sup>2+</sup>)组。

注4：为确保样品数值在标准曲线范围内，建议进行预实验将样品设置多个稀释倍数，以确定样品中铁离子的大致浓度，如果数值不在标准曲线范围内，请调整样品的稀释倍数或者样品的量。在适当的稀释倍数时，样品的信号值和样品中的铁含量通常会呈现出良好的线性关系。再根据预实验的结果，选取适宜的稀释倍数用于后续的测定，否则即使信号值在标准曲线的线性范围内，也可能无法得到理想的检测结果。

注5：样品总稀释倍数记为n (例如本步骤中对样品进行了2倍稀释，加入的‘稀释后的样品’为50μl，则n=2×100/50=4)。

注6：对于血清、细胞裂解液等铁离子含量较少的样品，不建议稀释样品，且样品量建议为50-100μl。

注7：如果白色浑浊物30分钟后仍然没有完全消失，可以适当震荡混匀加速白色浑浊的消除。

c. 每个孔加入10μl Iron Probe，混匀，37°C避光反应30分钟。

注：如果吸光度偏低，可适当延长反应时间，例如反应45-60分钟。随着反应时间的延长，高浓度标准品孔的信号值可能会达到平台，从而导致其不在标准曲线的线性范围内，此时可以舍去异常点的数据，取线性范围内的数据进行标准曲线的拟合。

d. 用酶标仪测定593nm处的吸光度，测得的空白对照吸光度值，记录为A<sub>Blank</sub>，测得的标准品吸光度值，记录为A<sub>Standard</sub>，测得的样品亚铁离子吸光度值，记录为A<sub>Fe<sup>2+</sup></sub>，测得的样品总铁离子吸光度值，记录为A<sub>Total</sub>。各吸光度值均减掉A<sub>Blank</sub>，记录为ΔA<sub>Standard</sub>、ΔA<sub>Fe<sup>2+</sup></sub>和ΔA<sub>Total</sub>。

e. 将ΔA<sub>Fe<sup>2+</sup></sub>或者ΔA<sub>Total</sub>代入标准曲线，即可计算出亚铁离子浓度，记录为B<sub>Fe<sup>2+</sup></sub>和总铁离子浓度，记录为B<sub>Total</sub>。

f. 根据实验需求在下表中选择适当的公式计算铁离子浓度C。

Calculation Method	Formula	Note
按样品质量计算	$C(\text{nmol/mg}) = B \times n \times V_{\text{Sample}} / W_{\text{Sample}}$	V <sub>Sample</sub> , 细胞或组织裂解后的总体积(ml) W <sub>Sample</sub> , 样品质量(mg)
按样品蛋白浓度计算	$C(\text{nmol/mg}) = B \times n / C_{\text{Protein}}$	C <sub>Protein</sub> , 样品蛋白浓度(mg/ml)
按铁离子浓度直接计算	$C(\mu\text{M}) = B \times n$	-

g. 计算示例：样品的蛋白浓度C<sub>Protein</sub>经测定为1mg/ml，未经稀释，样品量为50μl，则n=2，参考样品测定步骤进行测定。测出的A<sub>Fe<sup>2+</sup></sub>=0.419，A<sub>Blank</sub>=0.0425，则ΔA<sub>Fe<sup>2+</sup></sub>=0.3765，根据图2B拟合的标准曲线公式： $y=0.01012x+0.05814$ ，计算出待测样品中的亚铁离子浓度B<sub>Fe<sup>2+</sup></sub>=31.46μM，按样品蛋白浓度计算，则待测样品中亚铁离子浓度C(nmol/mg)=31.46μM×2/1mg/ml=62nmol/mg。

## 参考文献：

- Anne Marie U, Murererehe J, Rehman M, Chittilla M, Uwambaye P, et al. Front Nutr. 2023. 10:1272902.
- Wallace DF. Clin Biochem Rev. 2016. 37(2):51-62.
- Wincup C, Sawford N, Rahman A. Expert Rev Clin Immunol. 2021. 17(9):957-967.
- Chifman J, Laubenbacher R, Torti SV. Adv Exp Med Biol. 2014. 844:201-25.

## 相关产品：

产品编号	产品名称	包装

S1052	Fura-2 AM (钙离子荧光探针, 2mM)	50μl
S1056	Fluo-3 AM (钙离子荧光探针, 5mM)	20μl
S1060	Fluo-4 AM (钙离子荧光探针, 2mM)	25μl
S1061	Fluo-4钙离子检测试剂盒	200次/1000次
S1063S	钙含量显色检测试剂盒	200次
S1066	铁离子与亚铁离子检测试剂盒(显色法)	100次/500次
S1068	亚铁离子检测试剂盒(显色法)	100次/500次
S1070	细胞亚铁离子红色荧光检测试剂盒(RhoNox-6)	50-500次/250-2500次
S1075	铜离子检测试剂盒(显色法)	100次/500次

Version 2025.10.10