



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

细胞亚铁离子红色荧光检测试剂盒(RhoNox-6)

产品编号	产品名称	包装
S1070S	细胞亚铁离子红色荧光检测试剂盒(RhoNox-6)	50-500次
S1070M	细胞亚铁离子红色荧光检测试剂盒(RhoNox-6)	250-2500次

产品简介:

- 碧云天的细胞亚铁离子红色荧光检测试剂盒(RhoNox-6)，英文名称为Cellular Red Fluorescent Ferrous Ion Assay Kit with RhoNox-6，是一种基于红色荧光探针RhoNox-6，快速灵敏地检测活细胞内亚铁离子(Fe^{2+})的试剂盒。本试剂盒可以使用荧光显微镜进行荧光成像检测，也可以使用荧光酶标仪和流式细胞仪等进行荧光的定量检测。
- 本试剂盒中的RhoNox-6与Dojindo Laboratories公司的FerroOrange的检测原理和检测方法基本一致。
- 铁(Iron)是人体中丰度较高的必需微量元素之一[1]，通常以还原态的二价铁离子(Fe^{2+} , Ferrous Ions)和氧化态的三价铁离子(Fe^{3+} , Ferric Ions)两种状态存在，这两种状态间氧化还原循环的平衡有助于铁作为酶和蛋白等活性所需的辅助因子，以维持酶和蛋白等的正常生物学功能[2]。此外，铁是人体蛋白合成重要原料，含铁蛋白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]。受细胞质内天然的还原性微环境以及亚铁离子较高水溶性的影响，细胞内游离铁主要以亚铁(二价铁)离子形式存在。细胞内铁稳态的精确调控对细胞存活至关重要，铁浓度的失衡可能导致多种疾病的发生。铁浓度过高时，亚铁离子可通过Fenton反应催化产生羟基自由基($\cdot\text{OH}$)，进而引发脂质过氧化、蛋白质变性和DNA损伤，与癌症、阿尔茨海默病等重大疾病密切相关。相反，铁浓度过低会阻碍血红素合成，引发缺铁性贫血，导致组织缺氧、免疫力下降等临床症状[4]。因此这种双向的病理关联性表明，细胞内铁浓度的精准检测对于理解细胞生理功能、揭示疾病机制以及指导临床诊疗至关重要。
- RhoNox-6是一种新型亚铁离子红色荧光探针(Fe^{2+} Red Fluorescent Probe)，也称 Fe^{2+} indicator或 Fe^{2+} Probe，与亚铁橙(FerroOrange)或RhoNox-4的检测效果基本一致。RhoNox-6具有高选择性和高灵敏度，能特异性结合亚铁离子，而不受钙、镁、锌和铜等常见金属离子的干扰。该探针还具备优异的细胞膜通透性、低细胞毒性和稳定性，可用于活细胞内亚铁离子的实时荧光成像，并支持长时间监测及高通量检测。与亚铁离子结合后，其荧光信号显著增强，从而实现对活细胞内游离亚铁离子的精准检测。RhoNox-6特别适用于细胞的铁代谢、氧化应激以及铁死亡(Ferroptosis)等的研究。RhoNox-6在细胞内与亚铁离子结合后的最大激发波长为545nm，发射波长为585nm。RhoNox-6与亚铁离子结合后的激发光谱和发射光谱请参考图1。

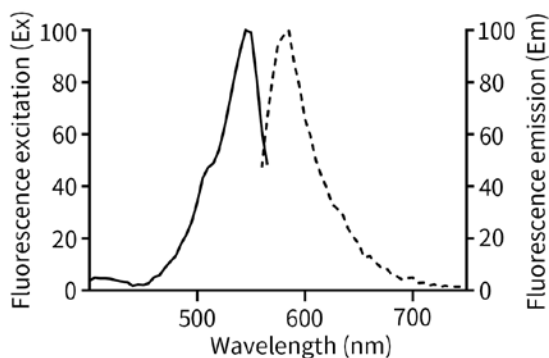


图1. 细胞亚铁离子红色荧光检测试剂盒(RhoNox-6) (S1070)中的RhoNox-6与亚铁离子结合后的激发光谱和发射光谱。

- RhoNox-6在水及其它极性溶剂中几乎不发出荧光，仅在与亚铁离子结合后才会发出明亮的红色荧光，表现出高度的选择性。使用本试剂盒检测亚铁离子与其它常见金属离子的对比效果请参考图2。

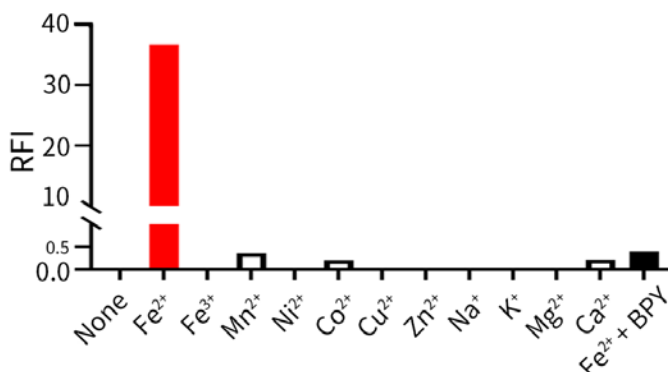


图2. 碧云天细胞亚铁离子红色荧光检测试剂盒(RhoNox-6) (S1070)对亚铁离子(Fe^{2+})的选择性效果图。在测量RhoNox-6对不同金属离子的荧光响应时,在 $2\mu\text{M}$ RhoNox-6的溶液中,以未添加金属离子的荧光信号作为基线(None),对比加入不同金属离子后的荧光变化,纵坐标即为相对荧光强度(Relative fluorescence intensity, RFI),其中 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 K^+ 和 Ca^{2+} 的终浓度为 1mM ,其它金属离子的终浓度为 $20\mu\text{M}$ 。孵育1小时后,使用荧光酶标仪测定荧光强度变化,激发波长为 540nm ,发射波长为 575nm ,波长宽度为 5nm ,顶读。结果显示,和其它金属离子相比,RhoNox-6仅在结合亚铁离子(Fe^{2+})后发出显著的荧光信号,表现出高度的选择性,而且加入 2mM 亚铁离子螯合剂2,2'-联吡啶(2,2'-Bipyridine, BPY)后,荧光强度显著下降,进一步证实RhoNox-6对亚铁离子的特异性识别能力。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异,本图仅供参考。

➤ RhoNox-6仅适用于活细胞染色,不能用于固定或经膜通透处理的细胞或组织。使用荧光显微镜、荧光酶标仪和流式细胞仪检测RhoNox-6染色活细胞内亚铁离子的效果请分别参考图3、图4A和图4B。

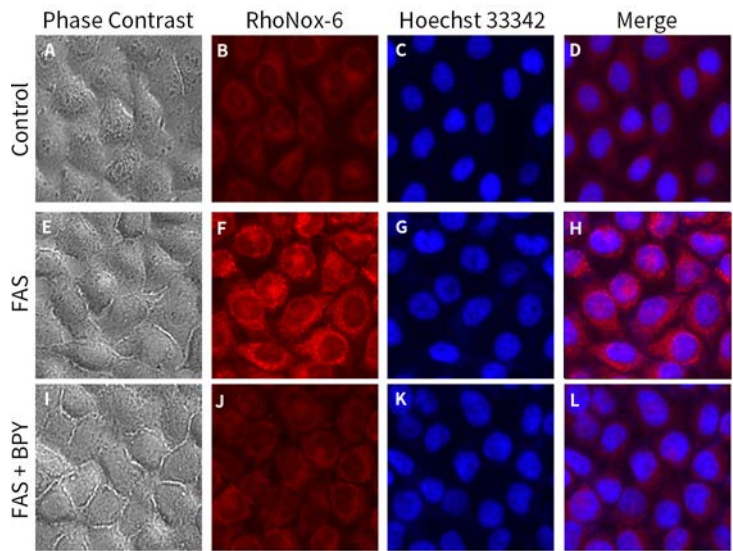


图3. 碧云天细胞亚铁离子红色荧光检测试剂盒(RhoNox-6) (S1070)对HeLa细胞的染色效果图。图B为正常细胞内亚铁离子(Fe^{2+})呈现较弱的红色荧光,这表明细胞内存在内源性的亚铁离子。经 $100\mu\text{M}$ 硫酸亚铁铵(Ferrous ammonium sulfate, FAS)处理30分钟后,细胞内亚铁离子含量增加,经RhoNox-6染色后红色荧光强度显著增强(图F)。进一步加入 1mM 亚铁离子螯合剂2,2'-联吡啶(2,2'-Bipyridine, BPY)后,BPY结合亚铁离子并阻止其与RhoNox-6反应,因此红色荧光信号明显降低(图J)。经Hoechst 33342染色的细胞核呈蓝色荧光(图C、G、K),RhoNox-6和亚铁离子反应后产生的红色荧光和细胞核蓝色荧光的叠加(Merge)效果见图D、H、L。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异,图中效果仅供参考。

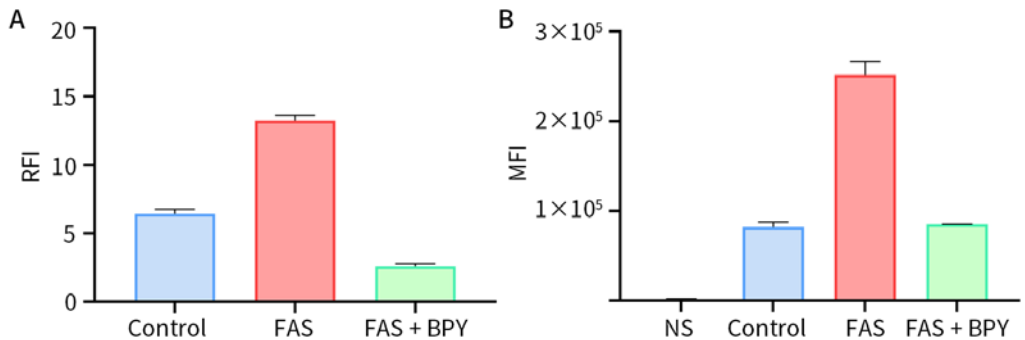


图4. 碧云天细胞亚铁离子红色荧光检测试剂盒(RhoNox-6) (S1070)用于荧光酶标仪和流式细胞仪检测的效果图。Control组为未经任何处理但经过RhoNox-6染色的细胞,NS组为未经任何处理且未染色的细胞。图A为荧光酶标仪检测效果,HeLa细胞分别经 $400\mu\text{M}$ FAS、 $400\mu\text{M}$ FAS + 4mM BPY处理15分钟后,使用RhoNox-6染色液进行染色,随后进行荧光酶标仪检测(Ex/Em= $545/585\text{nm}$,波长宽度为 5nm ,顶读),RFI为相对荧光强度(Relative Fluorescence Intensity)。图B为流式细胞仪检测效果,HeLa细胞分别经 $100\mu\text{M}$ FAS、 $100\mu\text{M}$ FAS + 1mM BPY处理30分钟后,使用RhoNox-6染色液进行染色,随后使用流式细胞仪的PE (Ex/Em= $561/585$)通道进行检测,MFI为平均荧光强度(Mean Fluorescence Intensity)。检测结果显示经FAS处理的HeLa细胞荧光强度显著增强,即细胞内亚铁离子水平显著增加,而加入亚铁离子螯合剂BPY后荧光强度显著降低,即细胞内亚铁离子水平显著下降。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异,图中结果仅供参考。

➤ 对于96孔板中的样品,按照每孔使用 $100\mu\text{l}$ RhoNox-6染色液计算,本试剂盒的小包装和中包装分别可以进行500次和2500次检测;如果用于流式细胞仪检测,按照每个样品的检测体系体积为 0.5ml 时,本试剂盒的小包装和中包装分别可以进行100次和500次检测;对于6孔板中的贴壁培养细胞样品,按照每孔使用 1ml RhoNox-6染色液计算,本试剂盒的小包装和中包装分别可以进行50次和250次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S1070S-1	RhoNox-6 (1000X)	50μl
S1070S-2	Hoechst 33342 (1000X)	50μl
S1070S-3	Assay Buffer	50ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S1070M-1	RhoNox-6 (1000X)	250μl
S1070M-2	Hoechst 33342 (1000X)	250μl
S1070M-3	Assay Buffer	250ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。RhoNox-6 (1000X)和Hoechst 33342 (1000X)须避光保存。

注意事项：

- 请酌情自备诱导细胞内亚铁离子浓度变化的试剂，如FAS (硫酸亚铁铵)与BPY (2,2'-联吡啶)，推荐选购碧云天硫酸亚铁铵六水(99.99% metals basis) (Y000832)、2,2'-联吡啶(99%) (Y137312)。
- 第一次使用时建议把RhoNox-6 (1000X)适当分装后保存，以避免反复冻融。
- 血清和酚红(Phenol red)对本试剂盒中RhoNox-6荧光探针的检测有干扰，须尽量避免。其中血清的干扰比较严重，强烈建议避免使用；酚红的存在会导致荧光背景增强，检测效果略有下降。
- 本试剂盒仅限于存活的细胞或组织的检测，不可用于固定或冻存的细胞或组织样品的检测。对于需要胰酶消化处理的细胞，建议先进行胰酶消化，然后再进行RhoNox-6染色。
- RhoNox-6须避免与金属离子接触。
- RhoNox-6在4°C、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，可以20-25°C水浴温育片刻至全部融解并适当离心至管底后使用。
- RhoNox-6的工作浓度、细胞量、孵育温度和时间等可根据所使用的细胞和给予的特定刺激预先进行适当摸索和优化，例如RhoNox-6的浓度可在0.5X-2.5X之间适当调整。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 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. RhoNox-6染色液的配制。

按照96孔板每孔100μl RhoNox-6染色液(RhoNox-6 Staining Solution)的体系，参考下表配制适量的RhoNox-6染色液，并充分混匀。

Reagent	1 Sample	10 Samples	100 Samples
RhoNox-6 (1000X)	1μl	10μl	100μl
Hoechst 33342 (1000X)	1μl	10μl	100μl
Serum-free Cell Culture Medium	998μl	9.98ml	99.8ml
RhoNox-6 Staining Solution	1ml	10ml	100ml

注1：配制好的RhoNox-6染色液必须一次使用完毕，不能冻存。RhoNox-6染色液中RhoNox-6的浓度可以根据染色效果在0.5X-2.5X之间适当调整。

注2：血清和酚红(Phenol red)对RhoNox-6荧光探针的检测有干扰，须避免。如果酚红不可避免，可染色后换成Assay Buffer。也可以直接使用Assay Buffer进行RhoNox-6染色液的配制，但染色效果可能没有无血清无酚红的细胞培养液好。

注3：Hoechst 33342染色为可选，可根据实际需求进行选做。Hoechst 33342为蓝色荧光，最大激发波长为346nm，最大发射波长为460nm。

2. 阳性/阴性对照的诱导方法。

根据实验设计，诱导细胞内亚铁离子浓度变化可以选择使用转铁蛋白(Transferrin) (ST1135/ST1136)、铁死亡诱导剂(如Erastin (SC0224))或硫酸亚铁铵(Y000832)。硫酸亚铁铵(FAS)和亚铁离子螯合剂BPY可用于快速调控细胞内亚铁离子浓度变化，可作为相关实验的对照。具体处理方法如下：

a. 试剂准备。

- 100μM FAS的配制：用去离子水配制适量的10mM的FAS母液。使用时用不含血清的细胞培养液稀释至终浓度为100μM。
- 1mM BPY的配制：用DMSO配制100mM的BPY储存液，保存于4°C。使用前需平衡至室温，振荡混匀。使用时用不含血清的细胞培养液稀释至终浓度为1mM。

注1: 由于FAS易析出, 建议每次现用现配新鲜的母液。

注2: BPY需密封保存, 避免潮解。

注3: FAS和BPY对细胞的影响因细胞类型而异, 因此建议根据特定的细胞适当调整使用终浓度。实验前需进行预实验, 确定比较适合的浓度。

b. 细胞处理。

使用FAS或FAS + BPY处理待检测的细胞, 置于细胞培养箱中孵育15-30分钟。仅使用FAS处理的为阳性对照(Positive control), 使用FAS + BPY共处理的为阴性对照(Negative control)。根据实验需求, 孵育时间可进行适当调整。孵育结束后, 用HBSS轻柔洗涤细胞3次, 随后可使用RhoNox-6染色液进行染色。

注: 细胞使用FAS或FAS + BPY处理可能对细胞活力有影响, 定量检测时建议使用碧云天的CCK-8试剂盒、CellTiter-Lumi™ 发光法细胞活力检测试剂盒或BeyoClick™ EdU细胞增殖检测试剂盒等产品进行检测, 并和RhoNox-6检测结果进行校正处理(Normalization)。

3. 荧光显微镜检测。

a. 接种培养。将细胞接种于96孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上。如有必要, 按实验设计对细胞进行一定处理(如诱导铁死亡)。

b. 洗涤。对于贴壁细胞, 吸除培养液, 酌情用HBSS轻柔洗涤细胞1-3遍; 对于悬浮细胞, 250-1000×g室温离心5分钟, 吸除上清, 用HBSS轻柔洗涤1-3遍。血清对于本试剂盒的染色有一定的干扰。

注: 对于贴壁细胞, 如果需要同时检测其中的非贴壁细胞, 例如诱导铁死亡后不再贴壁的细胞, 每次洗涤吸除液体前须适当离心, 以确保不再贴壁的细胞不会被吸走。

c. 染色。加入适当体积的RhoNox-6染色液。通常96孔板每孔加入100μl, 24孔板每孔加入250μl, 12孔板每孔加入500μl, 6孔板每孔加入1ml。37°C避光孵育30分钟。

注1: 如果是首次实验不能确定孵育温度和时间, 建议先尝试37°C孵育30分钟, 观察荧光效果。如果荧光强度太弱, 则适当延长时间。

注2: 染色后洗涤可能导致染色变弱, 因此建议孵育完成后不洗涤直接进行检测, 以确保检测结果的准确性。

d. 检测。孵育结束后, 如果使用不含血清和酚红的细胞培养液配制染色液, 可以直接在荧光显微镜下观察染色效果(RhoNox-6为红色荧光, Ex/Em=545/585nm)。如果使用无血清但含酚红的细胞培养液配制染色液, 建议根据细胞类型去除染色液(对于贴壁细胞, 需吸除染色液; 对于悬浮细胞, 需在室温下以250-1000×g离心5分钟, 吸除上清), 再加入本试剂盒提供的Assay Buffer进行检测。

4. 流式细胞仪检测。

a. 细胞准备。贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬, 400×g室温离心5分钟, 弃上清; 悬浮细胞250-1000×g室温离心5分钟, 弃上清。每个样品推荐的细胞用量为50-100万个细胞。

b. 洗涤。用HBSS轻轻重悬细胞, 400×g室温离心5分钟, 弃上清。如有必要, 可以再重复洗涤1-2次。

c. 染色。对于上一步骤的50-100万个细胞的沉淀, 加入0.5ml RhoNox-6染色液, 重悬为单细胞悬液。37°C避光孵育30分钟。

注1: 如果是首次实验不能确定孵育温度和时间, 建议先尝试37°C孵育30分钟, 观察荧光效果。如果荧光强度太弱, 则适当延长时间。

注2: 染色后洗涤可能导致染色变弱, 因此建议孵育完成后不洗涤直接进行检测, 以确保检测结果的准确性。

d. 检测。孵育完成后, 可以直接进行流式细胞仪检测, 也可以250-1000×g室温离心5分钟沉淀细胞, 吸净液体后每个样品加入0.5ml Assay Buffer重悬细胞后用流式细胞仪检测(RhoNox-6为红色荧光, Ex/Em=545/585nm), 推荐用PE (Ex/Em=561/585)通道进行检测。

注1: 使用仅含检测缓冲液的并且未经染色的细胞样品用于流式检测的阴性对照设置。

注2: 由于流式检测比较灵敏, 使用的荧光探针浓度可能要比荧光显微镜检测时要低, 此时可根据细胞类型和实际染色情况对RhoNox-6稀释倍数进行适当调整。

5. 荧光酶标仪检测。

a. 接种培养。将细胞接种于96孔板黑色多孔板中, 如BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装) (FCP966), 每孔的细胞数需要控制在1000-10,000个, 通常宜在2000-5000个范围内。按实验设计对细胞进行一定处理(如诱导铁死亡)。

注: 细胞接种数量需要考虑到检测时的细胞数量。如果接种后需要培养一段时间或药物处理时间比较长, 则需要适当控制接种细胞数量, 使检测时细胞密度为70-90%为佳。

b. 洗涤。对于贴壁细胞, 吸除培养液, 用PBS洗涤细胞1遍; 对于悬浮细胞, 250-1000×g室温离心5分钟, 吸除上清, 用HBSS轻柔洗涤1-3遍。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰。

注: 对于贴壁细胞, 如果需要同时检测其中的非贴壁细胞, 例如诱导铁死亡后不再贴壁的细胞, 每次洗涤吸除液体前须适当离心, 以确保不再贴壁的细胞不会被吸走。

c. 染色。加入适当体积的RhoNox-6染色液, 通常96孔板每孔加入100μl。37°C避光孵育30分钟。

注1: 如果是首次实验不能确定孵育温度和时间, 建议先尝试37°C孵育30分钟, 观察荧光效果。如果荧光强度太弱, 则适当延长时间。

注2: 染色后洗涤可能导致染色减弱, 因此建议孵育完成后不洗涤直接进行检测, 以确保检测结果的准确性。

d. 检测。孵育结束后, 可以直接用荧光酶标仪检测(RhoNox-6为红色荧光, Ex/Em=545/585nm, 波长宽度推荐5nm或10nm, 顶读)。

参考文献：

1. Anne Marie U, Murererehe J, Rehman M, Chittilla M, Uwambaye P, et al. Front Nutr. 2023. 10:1272902.
2. Wallace DF. Clin Biochem Rev. 2016. 37(2):51-62.
3. Wincup C, Sawford N, Rahman A. Expert Rev Clin Immunol. 2021. 17(9):957-967.
4. Belaidi AA, Bush AI. J Neurochem. 2016. 139(1):179-197.

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	铁离子检测试剂盒(显色法)	100次/500次
S1068	铜离子检测试剂盒(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

Version 2025.04.21