细胞二价铁离子（Fe^{2+}）荧光法检测试剂盒

产品编号：MA0647　规格：10T / 96T

产品内容

产品组成	MA0647-1 10T	MA0647-2 96T	储存温度
探针溶液（2 mmol/L）	0.01 mL	0.1 mL	-20℃
细胞染色缓冲液	10 mL	100 mL	4℃
说明书	1 份	1 份	

产品简介

铁是人体必需的微量元素之一，是生物体内最丰富的过渡金属元素，是血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素及其他酶系统的主要成分。铁稳态的任何变化都可能导致铁超载疾病。近年来，活细胞中的游离铁受到广泛关注，游离铁最常以其稳定的氧化还原态存在，即亚铁离子（Fe^{2+}）和铁离子（Fe^{3+}）。对研究者来说，在研究细胞内的还原环境、金属转运蛋白和 Fe^{2+}的水溶性时，了解 Fe^{2+}的行为比了解 Fe^{3+}的行为更为重要。因此，准确、方便和经济地量化生物组织内亚铁离子（Fe^{2+}），对于临床评估铁负荷、研究这些疾病的机制以及评估铁死亡诱导通路的活性具有巨大价值。

细胞二价铁离子（Fe^{2+}）荧光法检测试剂盒（Cell Ferrous Iron (Fe^{2+}) Fluorometric Assay Kit），包含二价铁离子检测探针和用于细胞标记的染色缓冲液。该探针可用于测量、检测或筛选 Fe^{2+}，适用于活细胞内 Fe^{2+}的检测。当探针与 Fe^{2+}反应后，可生成一种不可逆的橙红色荧光产物（激发波长：540-550 nm，发射波长：570-580 nm）。以 96 孔板为例，MA0647-1 可检测 10 个孔的样品；MA0647-2 可检测 96 个孔的样品。

使用方法

（一）确定染色试剂的最佳浓度（可选）：

用于细胞染色时，建议探针的工作浓度为 1-5 μM。由于不同细胞种类、细胞浓度的染色条件不同，可在使用过程中自行调试。

（二）染色工作液的配制：

以下步骤以探针工作浓度为 1 μM 为例，也可以根据步骤（一）确定的最佳浓度来配制工作液。一般来说，满足信号足够的前提下，尽可能选择最低浓度的探针剂量。

1. 取出探针溶液（2 mmol/L）和细胞染色缓冲液，平衡至室温。

【注】建议首次使用时将探针溶液（2 mmol/L）分装后于-20°C 避光保存，避免反复冻融。

2. 按照样品数和孔板类型计算所需染色工作液量，例如 96 孔板一个孔需要 100μL 的染色工作液，如果 20 个样品孔，则需要配制 2ml 的染色工作液，即在 2mL 的细胞染色缓冲液中加入 1μL 的探针溶液（2 mmol/L），涡旋震荡混匀制成染色工作液。 剩下的细胞染色缓冲液可作为洗涤液备用。

3. 所得到的染色工作液（1 μM）可直接用于细胞染色。

（三）细胞检测步骤：

1. 悬浮细胞：（悬浮细胞也可制作成细胞爬片，按照贴壁细胞步骤进行检测）

① 离心收集细胞，加入 PBS 或无血清培养基洗涤 2-3 次。

② 更换为含有药物的培养基，在 37℃，5% CO_2 培养箱中培养。

【注】请根据药物特性优化培养时间。

③ 离心去除培养基，用细胞染色缓冲液清洗 2-3 次。

④ 每 10^6 个细胞加入 1ml 染色工作液。在 37℃，5% CO_2 培养箱中孵育 20-60 min。无需清洗，孵育后直接进行检测。

【注】生成的荧光物质容易淬灭，孵育完成后最好在 2 h 之内进行测定，防止荧光减弱。

⑤ 用荧光酶标仪或流式细胞仪进行检测。探针与细胞内亚铁离子结合呈现橙红色荧光（E_x/E_m=543/580 nm）。

2. 贴壁细胞：

① 贴壁细胞可以接种至细胞培养板、微孔板或者制作成细胞爬片。在 37℃，5% CO_2 培养箱中过夜培养。

② 弃去上清液，并用 PBS 或无血清培养基洗涤细胞 2-3 次。

③ 更换为含有药物的培养基，在 37℃，5% CO_2 培养箱中培养。

【注】请根据药物特性优化培养时间。

④ 去除培养基，用细胞染色缓冲液清洗 2-3 次。

⑤ 加入足量的染色工作液，保证没过单层细胞。在 37℃，5% CO_2 培养箱中孵育 20-60 min。无需清洗，孵育后直接进行观察。

【注】生成的荧光物质容易淬灭，孵育完成后最好在 2 h 之内进行测定，防止荧光减弱。

⑥ 在荧光显微镜下观察细胞。探针与细胞内亚铁离子结合呈现橙红色荧光（E_x/E_m=543/580 nm）。

保存条件

探针溶液（2 mmol/L）-20℃避光密封保存，细胞染色缓冲液 2-8℃保存，自生产之日起 6 个月有效。

注意事项

1. 探针溶液避免反复冻融，使用前需要充分融解混匀，变成液体状态后离心直至液体离至管底部再开盖。
2. 染色工作液必须现配现用，配制好的工作液请在当天使用。
3. 本试剂盒适用于活细胞检测，对死细胞无法发挥出探针的正常性能。
4. 更换培养基会导致探针泄漏到细胞外，因此染色后不要更换培养基。
5. 设置对照组：为了检查铁检测的实验条件，建议准备 1 个加入铁螯合剂 Bpy (2,2'-Bipyridine)（阴性对照）或硫酸亚铁(Ⅱ)铵（阳性对照）的样品，并观察荧光强度的变化。
6. 荧光染料均存在淬灭问题，保存和使用本试剂盒的过程中请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。建议染色后尽量当天完成检测。
7. 为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。

Y240802