

血清总铁结合能力（TIBC）检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10519

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 1 mL×1 支	4°C保存
试剂四 A	液体 2.5 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四 B	液体 2.5 mL×1 瓶	4°C保存
试剂五	液体 12 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂四：临用前根据用量将 A 液和 B 液按 1:1 混合；
- 2、标准品：临用前加入 0.9mL 蒸馏水溶解，得到 40 μ mol/mL FeSO₄·7H₂O 溶液。再用蒸馏水稀释至 0.5 μ mol/mL 标准液备用。

产品说明：

血清总铁结合能力指血清转铁蛋白可结合铁的能力，其含量高低与缺铁性贫血、急性肝炎等疾病的发生密切相关。

Fe²⁺与菲洛嗪反应形成紫红色化合物，在562nm处有特征吸收峰。碱性条件下，血清转铁蛋白可以与Fe³⁺结合，剩余未结合的Fe³⁺可以被还原成Fe²⁺，此时吸光度A1与未结合Fe³⁺数量正相关。酸化后，转铁蛋白结合的Fe³⁺释放，并且进一步被还原成Fe²⁺，此时吸光度A2与总Fe³⁺数量正相关。A2减A1与TIBC呈正比。

技术指标：

最低检出限：第一次测量的检出限为 0.00098 μ mol/mL；第二次测量的检出限为 0.0012 μ mol/mL。

线性范围：第一次测量的线性范围为 1.95 $\times 10^{-3}$ -0.5 μ mol/mL；第二次测量的线性范围为 1.95 $\times 10^{-3}$ -0.5 μ mol/mL。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、微量玻璃比色皿/96孔板、EP管、蒸馏水。

操作步骤：

一、测定步骤（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 562nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、样本测定（在 EP 管中加入下列试剂）

试剂名称（ μL ）	测定管	空白管	标准管
血清	40	-	-
标准液	-	-	40
蒸馏水	-	40	-
试剂一	280	280	280
试剂二	40	-	-
试剂三	-	40	40
混匀，37°C，10min			
试剂四	40	40	40
混匀，37°C反应 5min，吸取 200 μL 于微量比色皿或者 96 孔板中，测定 562nm 处吸光值，分别记为 A1 测、A1 空、A1 标，并计算 $\Delta A1 \text{ 测} = A1 \text{ 测} - A1 \text{ 空}$ 、 $\Delta A1 \text{ 标} = A1 \text{ 标} - A1 \text{ 空}$ 。测定完成后将反应液吸回各 EP 管中。再继续加入试剂五。			
试剂五	120	120	120
混匀，37°C反应 5min，吸取 200 μL 于微量比色皿或者 96 孔板中，测定 562nm 处吸光值，分别记为 A2 测、A2 空、A2 标，并计算 $\Delta A2 \text{ 测} = A2 \text{ 测} - A2 \text{ 空}$ 、 $\Delta A2 \text{ 标} = A2 \text{ 标} - A2 \text{ 空}$ 。空白管和标准管只需做 1-2 次。			

二、血清总铁结合力计算：

总铁结合能力定义：37°C条件下，每升血清结合 Fe^{3+} 的 μmol 数。

$$\begin{aligned} \text{总铁结合能力 TIBC } (\mu\text{mol/L}) &= C \text{ 标准} \times \Delta A2 \text{ 测} \div \Delta A2 \text{ 标} - C \text{ 标准} \times \Delta A1 \text{ 测} \div \Delta A1 \text{ 标} \\ &= 500 \times (\Delta A2 \text{ 测} \div \Delta A2 \text{ 标} - \Delta A1 \text{ 测} \div \Delta A1 \text{ 标}) \end{aligned}$$

C 标准：标准液浓度，0.5 $\mu\text{mol/mL}$ =500 $\mu\text{mol/L}$ ；V 样：加入血清样本体积，0.04mL=40 $\times 10^{-6}\text{L}$ 。

注意事项：

1. A1 小于 0.1 时，样本适当稀释再测定，注意计算公式里乘以稀释倍数。
2. 试剂二、试剂四有一定的毒性，操作时请做好防护措施。

实验实例：

- 1、取 40 μL 用蒸馏水稀释 2 倍的骆驼血清，按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A1 \text{ 测} = A1 \text{ 测} - A1 \text{ 空} = 0.342$ ， $\Delta A1 \text{ 标} = A1 \text{ 标} - A1 \text{ 空} = 0.746$ ， $\Delta A2 \text{ 测} = A2 \text{ 测} - A2 \text{ 空} = 0.735$ ， $\Delta A2 \text{ 标} = A2 \text{ 标} - A2 \text{ 空} = 0.550$ ，计算总铁结合能力得：
总铁结合能力 TIBC ($\mu\text{mol/L}$) = $500 \times (\Delta A2 \text{ 测} \div \Delta A2 \text{ 标} - \Delta A1 \text{ 测} \div \Delta A1 \text{ 标}) \times 2 = 877.919 \mu\text{mol/L}$ 。
- 2、取 40 μL 用蒸馏水稀释 2 倍的鹅血清，按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A1 \text{ 测} = A1 \text{ 测} - A1 \text{ 空} = 0.191$ ， $\Delta A1 \text{ 标} = A1 \text{ 标} - A1 \text{ 空} = 0.746$ ， $\Delta A2 \text{ 测} = A2 \text{ 测} - A2 \text{ 空} = 0.732$ ， $\Delta A2 \text{ 标} = A2 \text{ 标} - A2 \text{ 空} = 0.550$ ，计算总铁结合能力得：
总铁结合能力 TIBC ($\mu\text{mol/L}$) = $500 \times (\Delta A2 \text{ 测} \div \Delta A2 \text{ 标} - \Delta A1 \text{ 测} \div \Delta A1 \text{ 标}) \times 2 = 1074.877 \mu\text{mol/L}$ 。