

## 亚铁氧化酶（HP）活性检测试剂盒（微量法）

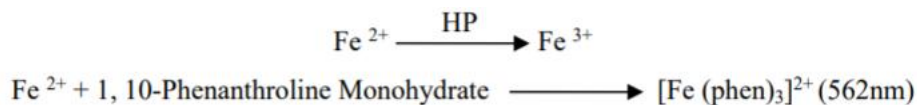
产品货号：BA1899

产品规格：100管/48样

### 产品简介：

亚铁氧化酶（Hsphasetin, HP）是铜蓝蛋白的同系物，催化亚铁离子（ $Fe^{2+}$ ）氧化为三价铁离子（ $Fe^{3+}$ ），从而三价铁与转铁蛋白结合，参与细胞铁释放。

以一定浓度的 $Fe^{2+}$ 为底物，在亚铁氧化酶的催化作用下 $Fe^{2+}$ 被氧化为 $Fe^{3+}$ ， $Fe^{2+}$ 与菲咯嗪形成有色复合物，在562nm处有特征吸收峰，先计算出未被氧化的 $Fe^{2+}$ 的含量，进而得出被氧化的 $Fe^{2+}$ 的含量，可通过 $Fe^{2+}$ 被氧化的速率来反映亚铁氧化酶活性。



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。

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体3mL×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1瓶	2-8℃
标准品	液体1mL×1支	2-8℃

### 溶液的配制：

1. 试剂三：临用前加入6mL蒸馏水溶解备用，用不完的试剂2-8℃保存4周。
2. 标准品：9 $\mu$ mol/mL的亚铁离子标准液。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水、EP管。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）：

1. 组织：按照质量（g）：蒸馏水体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g，加入1mL蒸馏水）加入蒸馏水，冰浴匀浆后于10000 rpm，4℃离心10min，取上清置于冰上待测。
2. 血清或血浆：建议用蒸馏水将血清或血浆稀释2~4倍后直接检测。若溶液浑浊则离心取上清置于冰上待测。

#### 二、测定步骤

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. 标准液的稀释：将9 $\mu$ mol/mL的亚铁离子标准液用蒸馏水倍比稀释为360、180、90、45、22.5、11.25、5.625nmol/mL的标准溶液备用。
3. 标准液稀释可参考下表：



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

序号	稀释前浓度 (nmol/mL)	标准液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 (nmol/mL)
1	9000	40	960	360
2	360	500	500	180
3	180	500	500	90
4	90	500	500	45
5	45	500	500	22.5
6	22.5	500	500	11.25
7	11.25	500	500	5.625

备注：实验中每个标准管需40μL标准溶液。

4. 操作表：在1.5mL离心管（分光光度计）或96孔板中依次加入下列试剂：

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	无基质管	空白管	标准管
蒸馏水	-	-	8	8	8
样本	8	8	-	-	-
试剂一	112	112	112	112	112
用移液枪充分吹打混匀					
试剂二	-	40	40	-	-
标准溶液	-	-	-	-	40
蒸馏水	40	-	-	40	-
混匀，37℃水浴锅或恒温培养箱中准确反应3min					
试剂三	40	40	40	40	40

混匀，于微量玻璃比色皿/96孔板中测定562nm处吸光值A，分别记为A对照管，A测定管、A无基质管、A空白管和A标准管。计算ΔA测定=(A无基质管-A空白管) - (A测定管-A对照管)，ΔA标准=A标准管-A空白管。每个测定管需设一个对照管，同一批次无基质管、空白管和标准管只需测1-2次。

### 三、亚铁氧化酶活性计算

#### 1. 标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度 (nmol/mL) 为x轴，其对应的ΔA标准为y轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将ΔA测定带入方程得到样本浓度 (x, nmol/mL)。

#### 2. 亚铁氧化酶活性的计算：

##### (1) 按照样本蛋白浓度计算

酶活定义：每mg蛋白每分钟氧化1nmol的 $Fe^{2+}$ 定义为1个酶活力单位。

$$\text{亚铁氧化酶酶活 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{试剂二}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times N = 1.667x \div C_{\text{pr}} \times N$$

##### (2) 按照样本质量计算

酶活定义：每g样品每分钟氧化1nmol的 $Fe^{2+}$ 定义为1个酶活力单位。

$$\text{亚铁氧化酶酶活 (U/g 鲜重)} = x \times V_{\text{试剂二}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{提取}}) \div T \times N = 1.667x \div W \times N$$

##### (3) 按液体体积计算

酶活定义：每mL样本每分钟氧化1nmol的 $Fe^{2+}$ 定义为1个酶活力单位。

$$\text{亚铁氧化酶酶活 (U/mL)} = x \times V_{\text{试剂二}} \div V_{\text{样}} \div T \times N = 1.667x \times N$$

V试剂二：加入的试剂二体积，0.04mL；V样：加入的样本体积，0.008mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本质量，g；T：反应时间：3min；N：稀释倍数。

#### 注意事项：

1. 当A测定低于0.1时，建议将样本用蒸馏水稀释后再进行测定，计算公式中乘以稀释倍数。



扫一扫 加微信

**郑州乐业生物科技有限公司**

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com