

亚铁氧化酶（HP）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：AC10681

规格：50T/24S

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 20 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 3 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	4°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂三：临用前加入 7 mL 蒸馏水溶解备用，用不完的试剂 4°C保存；4°C可以保存 4 周。
- 2、标准品：9 $\mu\text{mol/mL}$ 的亚铁离子标准液。

产品说明：

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 562 nm 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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、1 mL 玻璃比色皿、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 0.1 g，加入 1 mL 蒸馏水）加入蒸馏水，冰浴匀浆后于 4°C，10000 rpm 离心 10 min，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。

二、测定步骤

1、分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 562 nm，蒸馏水调零。

2、将 9 $\mu\text{mol/mL}$ 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、5.625 nmol/mL 的标准溶液备用。

3、操作表：在 1.5 mL 离心管中依次加入下列试剂：

试剂名称	对照管	测定管	无机质管	空白管	标准管
蒸馏水 (μL)	-	-	20	20	20
样本 (μL)	20	20	-	-	-
试剂一 (μL)	280	280	280	280	280
用移液枪充分吹打混匀					
试剂二 (μL)	-	100	100	-	-
标准溶液 (μL)	-	-	-	-	100
蒸馏水 (μL)	100	-	-	100	-
混匀, 37°C水浴锅或恒温培养箱中准确反应 3 min					
试剂三 (μL)	100	100	100	100	100
蒸馏水 (μL)	500	500	500	500	500
混匀, 于 1 mL 玻璃比色皿测定 562 nm 处吸光值 A, 分别记为 A 对照管、A 测定管、A 无基质、A 空白管和 A 标准管。计算 $\Delta A = (A \text{ 无基质管} - A \text{ 空白管}) - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})$, $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}$ 。每个测定管需设一个对照管, 同一批次检测需配 1-2 个无基质管与空白管。					

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 带入方程得到 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 1 nmol 的 Fe^{2+} 定义为 1 个酶活力单位。

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

(2) 按照样本质量计算

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

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

(3) 按液体体积计算

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

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, 0.1 mL; V 样: 加入的样本体积, 0.02 mL; 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: 3 min; 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。

实验实例:

1、取 0.1g 脾脏, 进行样本处理, 按照测定操作步骤, 测得计算 $\Delta A = (A \text{ 无基质管} - A \text{ 空白管}) - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) = (0.976 - 0.005) - (0.996 - 0.047) = 0.022$, 带入标准曲线 $y = 0.0027x + 0.0036$, 计算 $x = 6.815$, 按照样本质量计算酶活得:

亚铁氧化酶酶活 (U/g 质量) = $1.667 \times x \div W \times N = 1.667 \times 6.815 \div 0.1 = 113.603 \text{ U/g 质量}$ 。

2、取兔血清,按照测定操作步骤,测得计算 $\Delta A = (A_{\text{无基质管}} - A_{\text{空白管}}) - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) = (0.976 - 0.005) - (0.469 - 0.009) = 0.511$, 带入标准曲线 $y = 0.0027x + 0.0036$, 计算 $x = 187.926$, 按照液体体积计算酶活得:
亚铁氧化酶酶活 (U/mL) = $1.667 \times x = 1.667 \times 187.926 = 313.273$ U/mL。