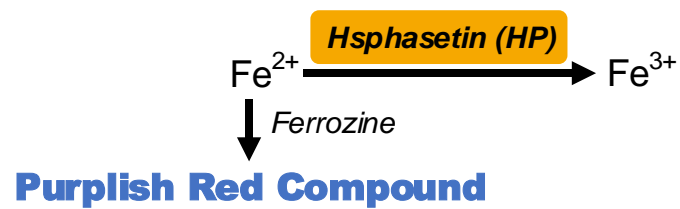




亚铁氧化酶 (HP) 活性检测试剂盒
Hephaestin (HP) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



亚铁氧化酶（HP）活性检测试剂盒

Hephaestin (HP) Activity Assay Kit

一、产品描述

亚铁氧化酶是一种铁转运蛋白,属于铜蓝蛋白的同系物,主要参与体内铁代谢过程,能够催化 Fe^{2+} 氧化生成 Fe^{3+} , 在铁离子的氧化、转运和代谢过程中起着重要作用, 在医学、环境科学、农业和工业等领域具有广泛应用。

亚铁氧化酶可催化 Fe^{2+} 氧化生成 Fe^{3+} , Fe^{2+} 与菲啰啉反应生成紫红色复合物, 产物在 562 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可评估 Fe^{2+} 氧化速率, 进而表征亚铁氧化酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
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	使用前加入 6 mL 蒸馏水充分溶解 (配制后 4°C 可保存一个月)
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C 保存	9 $\mu\text{mol/mL}$ 亚铁离子标准液
标准稀释液的制备 (现用现配): 使用前将 9 $\mu\text{mol/mL}$ 亚铁离子标准液使用蒸馏水稀释至 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125 $\mu\text{mol/mL}$ 充分混匀即为标准稀释液。			

序号	A	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	9.0	1.0	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025
标准液体积 (μL)	100	400	500	500	500	500	500
蒸馏水体积 (μL)	800	600	500	500	500	500	500
稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	1.0	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025	0.0125

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿 (光径 10 mm) /96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：蒸馏水体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 蒸馏水）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②血清（浆）、培养液等液体样本：直接测定或使用蒸馏水适当稀释后再进行测定。

2.测定步骤

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

②在 96 孔板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	对照组 (μL)	标准组 (μL)	空白组 1 (μL)	空白组 2 (μL)
粗酶液	8	8	-	-	-
蒸馏水	-	-	8	8	8
试剂一	112	112	112	112	112
充分混匀					
试剂二	40	-	-	-	40
标准稀释液	-	-	40	-	-
蒸馏水	-	40	-	40	-
充分混匀，37℃准确反应 3 min					
试剂三	40	40	40	40	40
充分混匀					

吸光值测定：测定 562 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准、A 空白 1 和 A 空白 2；计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{\text{空白 2}} - A_{\text{空白 1}}) - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白 1}}$ 。注：每个样品均需设一个对照组，标准组、空白组 1 和空白组 2 只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125 $\mu\text{mol/mL}$ 为横坐标 (x)，以其对应的 $\Delta A_{\text{标准}}$ 为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 带入公式中得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

3.亚铁氧化酶（HP）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟氧化 1 nmol Fe^{2+} 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HP (U/mg prot)} = \frac{x \times V_2 \times 10^3 \times D}{V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{1667 \times x \times D}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟氧化 1 nmol Fe²⁺ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HP (U/g)} = \frac{x \times V_2 \times V_{\text{样总}} \times 10^3 \times D}{V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{1667 \times x \times D}{W}$$

③按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟氧化 1 nmol Fe²⁺ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HP (U/mL)} = \frac{x \times V_2 \times 10^3 \times D}{V_{\text{样}} \times T} = 1667 \times x \times D$$

注释： V₂：反应体系中加入试剂二的体积，0.04 mL；V_样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.008 mL；V_{样总}：粗酶液总体积，1 mL；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，3 min；10³：单位换算系数，1 μmol = 10³ nmol；D：粗酶液稀释倍数，若未稀释则为 1。

四、注意事项

①若测定吸光值超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将粗酶液使用蒸馏水适当稀释后再进行测定，低于最低值建议适当增加样本量或延长酶促反应时间（37°C反应时间）后再进行测定，计算时相应修改；

②为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

