

亚铁氧化酶（Hephaestin,HP）试剂盒说明书

微量法 100管/48样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

Hephaestin (HP)作为铜蓝蛋白的同系物,是近年来发现的铁转运蛋白亚铁氧化酶, HP属亚铁氧化酶家族成员,具有亚铁氧化酶的活性,参与体内铁代谢。HP的表达可受铁、铜及锌等金属离子的调节。HP催化Fe²⁺氧化生成Fe³⁺, 在介导铁的跨膜转运中有重要作用。

测定原理：

HP催化Fe²⁺氧化为Fe³⁺, Fe²⁺和ferrozine反应显色, 在560 nm下有特征吸光值。通过测定Fe²⁺的减少速率可测得亚铁氧化酶的活性。

自备用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体60 mL×1瓶, 4°C保存;

试剂二：液体1.5 mL×1瓶, 4°C保存;

试剂三：液体11 mL×1瓶, 4°C避光保存。

粗酶液提取：

按照组织质量 (g) : 水 (mL)为1: 5~10的比例 (建议称取约0.1g组织, 加入1mL蒸馏水), 进行冰浴匀浆。10000g 4°C离心10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤：

1. 酶标仪预热30 min以上, 调节波长至560 nm。
2. 在96孔板中加入下列试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	50	50
试剂二	10	10
样本	10	10
蒸馏水	30	30
试剂三	混匀, 40°C静置30 min	100
试剂三	100	

混匀, 立即测定A对照和A测定, $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ 。(每个测定管需设一个对照管)

HP活性计算:

标准曲线: $y = 8.2135x - 0.0006$, $R^2 = 0.9998$; (x为标准品浓度, $\mu\text{mol/mL}$; y为吸光值 ΔA)

1. 按样本质量计算

单位定义: 每g样本每分钟氧化1nmol Fe^{2+} 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{HP} (\text{nmol/min/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0006) \div 8.2135 \times V_{\text{总}} \div T \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \\ &= 40.58 \times (\Delta A + 0.0006) \div W\end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

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

$$\begin{aligned}\text{HP} (\text{nmol/min/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0006) \div 8.2135 \times V_{\text{总}} \div T \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \\ &= 40.58 \times (\Delta A + 0.0006) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

$V_{\text{总}}$: 反应体系体积, 0.1 mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 30min; W : 样品质量, g;
 C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; 1000, μmol 到nmol的转换系数。