

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 Fe^{2+} 氧化生成 Fe^{3+} ，在介导铁的跨膜转运中有重要作用。

测定原理：

HP催化 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} ， Fe^{2+} 和ferrozine反应显色，在560 nm下有特征吸光值。通过测定 Fe^{2+} 的减少速率可测得亚铁氧化酶的活性。

自备仪器和样品：

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℃保存；

试剂二：液体1.5 mL×1瓶，4℃保存；

试剂三：液体11 mL×1瓶，4℃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℃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（ μ L）	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℃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）

亚铁氧化酶（Hephaestin,HP）试剂盒说明书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。

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

(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。

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

$V_{\text{总}}$ ：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。