

亚铁氧化酶（Hephaestin,HP）试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：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℃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 (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℃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 Fe²⁺ 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 Fe²⁺ 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_总：反应体系体积，0.1 mL；V_样：加入样本体积 0.01 mL；V_{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。
