

亚铁氧化酶 (Hephaestin,HP) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 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：

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 50 mL×1 瓶, 4°C保存;

试剂二：液体 3 mL×1 瓶, 4°C保存;

试剂三：液体 30 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. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 560 nm, 蒸馏水调零。
2. 在玻璃比色皿中加入下列试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	250	250
试剂二	50	50
样本	50	50
蒸馏水	150	150
试剂三	混匀, 40°C静置 30 min	500
试剂三	500	

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: $y = 16.427x - 0.0006$, $R^2 = 0.9998$; (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。

$$\begin{aligned} \text{HP (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0006) \div 16.427 \times V_{\text{总}} \div T \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \\ &= 20.29 \times (\Delta A + 0.0006) \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{HP (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0006) \div 16.427 \times V_{\text{总}} \div T \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \times 1000 \\ &= 20.29 \times (\Delta A + 0.0006) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；1000，μmol 到 nmol 的转换系数。