

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。

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

$$= 40.58 \times (\Delta A + 0.0006) \div W$$

(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。

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

$$= 40.58 \times (\Delta A + 0.0006) \div C_{\text{pr}}$$

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。