

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0971

Size: 100T/48S

亚铁氧化酶 (HP) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、测定原理:

HP 催化 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} , Fe^{2+} 和 ferrozine 反应显色, 在 560nm 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。

三、需自备的仪器和用品:

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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	

五、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。

六、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）		

七、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。

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

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

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, 1mL;

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。