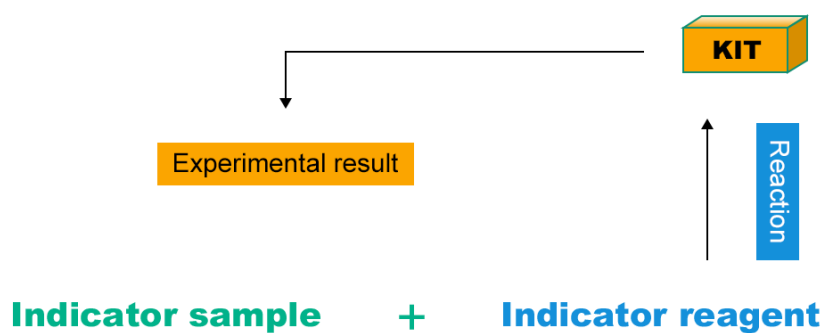


上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0972

Size: 50T/24S

## 亚铁氧化酶 (HP) 检测试剂盒说明书

### 分光光度法

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

#### 二、测定原理:

HP 催化 $\text{Fe}^{2+}$ 氧化为 $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ 和 ferrozine 反应显色, 在 560 nm 下有特征吸光值。通过测定  $\text{Fe}^{2+}$  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:

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。

#### 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 50 mL×1 瓶 | 4℃保存   |           |
| 试剂二 | 液体 3 mL×1 瓶  | 4℃保存   |           |
| 试剂三 | 液体 30 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. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 560nm, 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) |                    |     |

## 七、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  $\Delta A$ )。

### (1) 按样本质量计算

单位定义: 每 g 样本每分钟氧化  $1\text{nmol Fe}^{2+}$  定义为一个酶活力单位。

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

### (2) 按样本蛋白浓度计算

单位定义: 每 mg 蛋白每分钟氧化  $1\text{nmol Fe}^{2+}$  定义为一个酶活力单位。

$$\text{HP (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A + 0.0006) \div 16.427 \times V_{\text{总}} \div T \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \times 1000$$

---

$$= 20.29 \times (\Delta A + 0.0006) \div C_{pr}$$

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；C<sub>pr</sub>：样本蛋白浓度，mg/mL；1000，μmol 到 nmol 的转换系数。