

亚铁氧化酶（Hephaestin,HP）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 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：

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℃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。

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. 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℃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 Fe^{2+} 定义为一个酶活力单位。

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

（2）按样本蛋白浓度计算

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

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

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