



亚铁氧化酶活性检测试剂盒

HP Assay Kit

微量法

产品编号: AK472M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK472-A	60mL×1 瓶	4℃保存;
AK472-B	1.5mL×1 瓶	4℃保存;
AK472-C	11mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK472-标准品 (9 μmol/mL)	1mL×1 瓶	4℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 亚铁氧化酶 (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。

原理: 以一定浓度的 Fe^{2+} 为底物, 在亚铁氧化酶的催化作用下 Fe^{2+} 被氧化为 Fe^{3+} , Fe^{2+} 与菲咯嗪形成有色复合物, 在 562 nm 处有特征吸收峰, 先计算出未被氧化的 Fe^{2+} 的含量, 进而得出被氧化的 Fe^{2+} 的含量, 可通过 Fe^{2+} 被氧化的速率来反映亚铁氧化酶活性。

自备用品:

分光光度计/酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、水浴锅/恒温水浴锅、冰和蒸馏水。

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/酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长至 562 nm。
2. 标准品的稀释: 将 9μmol/mL 的亚铁离子标准液用蒸馏水倍比稀释为 360、180、90、45、22.5、11.25、5.625 nmol/mL 的标准溶液备用。
3. 样本测定: 在 96 孔板中加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)	对照管 (μL)	空白管	标准管
AK472-A	50	50	50	50
AK472-B	10	10	10	10
样本	10	10	10	
蒸馏水	30	30	30	30
标准品				10
AK472-C	混匀, 40℃静置 30 min	100	混匀, 40℃静置 30 min	
AK472-D	100		100	100

混匀, 于微量玻璃比色皿/96 孔板中测定 562 nm 处吸光值 A, 分别记为 A 对照, A 测定、A 空白和 A 标准。计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。每个测定管需设一个对照管, 空白管和标准管只需测 1-2 次。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 活性计算公式：

以各个标准溶液的浓度 (nmol/mL) 为 x 轴，其对应的 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入方程得到样本浓度 (x, nmol/mL)。

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。

$$HP (U/g \text{ 鲜重}) = x \times V_{AK472-B} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{提取}}) \div T \times N = 1.667x \div W \times N$$

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。

$$HP (U/mg \text{ prot}) = x \times V_{AK472-B} \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T \times N = 1.667x \div Cpr \times N$$

3. 按液体体积计算：

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。

$$HP (U/mg \text{ prot}) = x \times V_{AK472-B} \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T \times N = 1.667x \div Cpr \times N$$

注： 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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))