



亚铁氧化酶活性检测试剂盒

HP Assay Kit

分光光度法

产品编号：AK472V

产品规格：50T/24S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK472-A	18mL×1 瓶	4℃保存；
AK472-B	3.5mL×1 瓶	4℃保存；
AK472-C	35mL×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、1ml 玻璃比色皿、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:

试剂名称	测定管 (μL)	对照管 (μL)	空白管	标准管
AK472-A	250	250	250	250
AK472-B	50	50	50	50
样本	50	50		
蒸馏水	150	150	200	150
标准品				50
	混匀, 40℃静置 30 min		混匀, 40℃静置 30 min	
AK472-C	500	500	500	500

混匀, 于 1ml 玻璃比色皿中测定 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 $\Delta A_{测定} = A_{对照} - A_{测定}$, $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。
注: 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。

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。

$$HP (U/g \text{ 鲜重}) = x \times V_{\text{总}} \div T \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.33 x \div W$$

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。

$$HP (U/mg \text{ prot}) = x \times V_{\text{总}} \div T \div (Cpr \times V_{\text{样}}) = 0.33x \div Cpr$$

注: $V_{\text{总}}$: 反应体系体积, 0.5 mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积 0.05 mL; $V_{\text{样总}}$: 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。

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