



## 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；

※ 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：**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：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、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. 酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长至 560 nm。
2. 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)
AK472-A	50	50
AK472-B	10	10
样本	10	10
蒸馏水	30	30
AK472-C	混匀, 40℃静置 30 min	100
AK472-C	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)		

#### HP 活性计算公式：

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  $\Delta A$ )

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。

$$HP (\text{nmol/min/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0006) \div 8.2135 \times V_{\text{总}} \div T \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 = 40.58 \times (\Delta A + 0.0006) \div W$$

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 (nmol/min/mg prot) =  $(\Delta A + 0.0006) \div 8.2135 \times V_{\text{总}} \div T \div (Cpr \times V_{\text{样}}) = 40.58 \times (\Delta A + 0.0006) \div Cpr$

**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， $\mu\text{mol}$  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](#))