

土壤亚铁氧化酶（Ferroxidase）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0358F 分光法 24 样）

一、产品简介：

土壤亚铁氧化酶(EC 1.16.3.1)能够催化 Fe^{2+} 氧化生成 Fe^{3+} ，在土壤中铁代谢土壤的肥力中起着重要作用。

土壤亚铁氧化酶可催化 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} ， Fe^{2+} 与显色剂反应生成紫红色复合物，该有色物在 560nm 处有特征吸收峰，通过吸光值变化进而计算得出该酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×2 支	4℃保存	临用前甩几下，使粉体落入底部，每支再加 2mL 蒸馏水充分摇匀。
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下，使粉体落入底部，再加入 10mL 蒸馏水充分摇匀。
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、台式离心机、可调式移液器、水浴锅、和蒸馏水。

四、土壤亚铁氧化酶活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

1、样本制备：

取新鲜土样，或风干土或者 37 度烘箱风干土，先粗研磨，过 40 目筛网，备用。

2、上机检测：

- ① 打开分光光度计，调节波长至 560nm，蒸馏水调零。
- ② 试剂可解冻至室温，或于 25℃水浴 5-10min。在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	无基质管	无土管（仅做一次）
土样（g）	0.1	0.1	
试剂一	800	800	800
试剂二	100		100
蒸馏水		100	
充分混匀，37℃孵育反应 2min			
试剂三	100	100	100
8000rpm，4℃或室温离心 10min，上清液静置 5min 待测。			

③ 显色反应：在 EP 中依次加入：

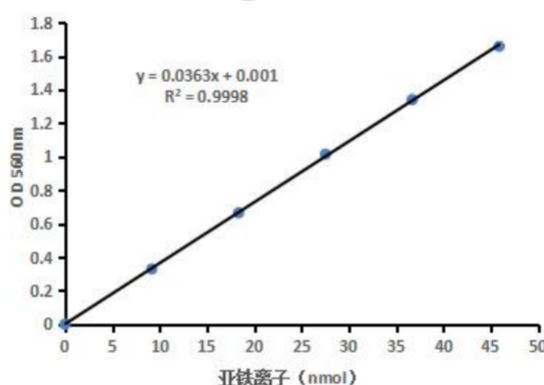
上清液	30	30	30
蒸馏水	570	570	570
试剂四	140	140	140
室温静置 5min，转移全部澄清液体（若有沉淀需 8000rpm 室温离心			

5min, 再取上清液) 至 1mL 比色皿 (光径 1cm), 在 560nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{无土管}} - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{无基质管}})$ 。

- 【注】: 1. 空白管 1 的颜色 (紫红色) 最深, 若测定管的颜色很浅或无色即 A 测定值低于 0.1, 说明样本里该酶活性高, 则可对样本用蒸馏水进行稀释后再加样测定, 稀释倍数记为 D; 或减少样本加样量 V1 (如减至 10 μ L, 则试剂一相应增加, 保持总体积不变), 或减少反应时间 T (如由 37 $^{\circ}$ C 孵育反应 5min 减至 1min)。则稀释倍数 D 和改变后的 T 和 V1 需重新代入公式计算。
2. 若测定管颜色与空白管颜色接近, 即 ΔA 在零附近 (小于 0.01), 说明样本里面该酶活性低, 则可增加样本加样量 V1 (如增至 60 μ L, 则试剂一相应减少, 保持总体积不变), 或增加反应时间 T (如由 37 $^{\circ}$ C 孵育反应 5min 增至 10min 或更长)。或增加取样质量 W。则改变后的 T 和 V1 和 W 需重新代入公式计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.0363x + 0.001$: x 为标准品浓度 (nmol/L), y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克土壤每分钟氧化 1nmol 的 Fe^{2+} 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{土壤亚铁氧化酶 (nmol/min/g)} = [(\Delta A - 0.001) \div 0.0363] \times (V \div V1) \div W \div T \times D$$

$$= 459.1 \times (\Delta A - 0.001) \div W \times D$$

V---②步中反应总体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.03mL;

T---反应时间, 2min;

W---样本质量, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 标准品: 用前甩几下使标品粉体落入底部, 再加入 1mL 蒸馏水溶解即 5 μ mol/mL。
- 2 把标准品母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度: 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 μ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 30 μ L 标准品+570 μ L 蒸馏水+140 μ L 试剂四, 显色 5min 后, 于 560nm 处读值, 依据结果即可制作标准曲线。