

土壤亚铁氧化酶（Ferroxidase）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0358W 微板法 48 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：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、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 打开酶标仪，调节波长至 560nm。

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 96 孔板中依次加入：

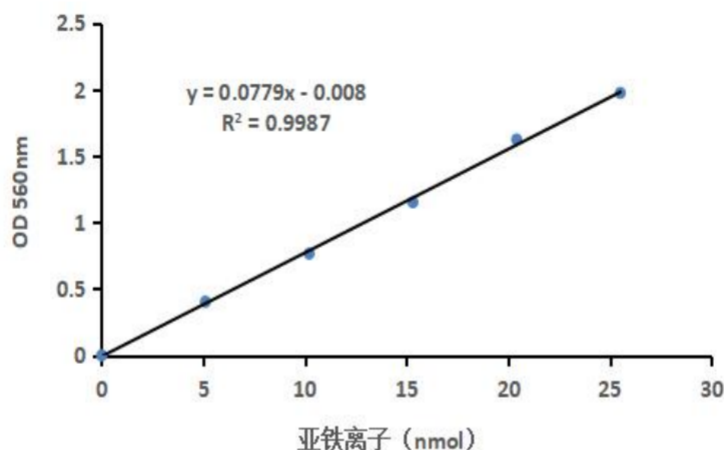
上清液	10	10	10
蒸馏水	150	150	150
试剂四	40	40	40
室温静置 5min，在 560nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{无土管}} - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{无基质管}})$ 。			

【注】：1.无土管的颜色（紫红色）最深，若测定管的颜色很浅或无色即 A 测定值低于 0.2，说明样本里该酶活性高，则减少土壤取样质量 W（如减至 0.05g）；或减少 37℃反应时间 T（如由 37℃孵育反应 2min 减至 1min）。则改变后的 W 和 T 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，则可增加土壤取样质量 W（如增至 0.2g 或更多）；或增加 37℃反应时间 T（如由 37℃孵育反应 2min 增至 5min 或更长）。则改变后的 W 和 T 需重新代入公式计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0779x - 0.008$ ；x 为标准品浓度(nmol)，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）。

$$\text{土壤亚铁氧化酶(nmol/min/g)} = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0779] \times (V \div V1) \div W \div T \times D \\ = 641.8 \times (\Delta A + 0.008) \div W \times D$$

V---②步中反应总体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

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 $5\mu\text{mol/mL}$ 。
- 2 把标准品母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度：0, 0.5, 1, 1.5, 2, $2.5\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 $10\mu\text{L}$ 标准品+ $150\mu\text{L}$ 蒸馏水+ $40\mu\text{L}$ 试剂四，显色 5min 后，于 560nm 处读值，依据结果即可制作标准曲线。