

亚铁氧化酶（Ferroxidase）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0177F 分光法 24 样）

一、产品简介：

亚铁氧化酶(EC 1.16.3.1)能够催化 Fe^{2+} 氧化生成 Fe^{3+} ，在铁代谢和抗氧化防御中起着重要作用。

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
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 1mL 去离子水溶解，再用去离子水稀释 10 倍后检测。溶解的液体分装冻存，避免反复冻融。
试剂三	液体 7mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂×1 支	4°C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、研钵、冰和蒸馏水。

四、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：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ 10^4 ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 打开分光光度计，调节波长至 560nm，蒸馏水调零。

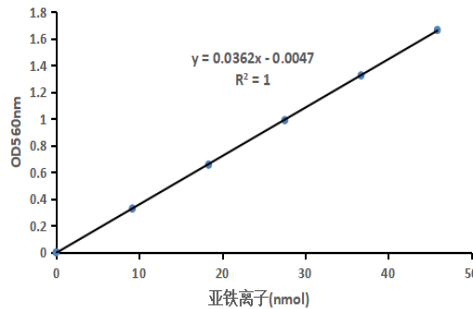
② 试剂一可解冻至室温，或于 37°C 水浴 5-10min。在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管	对照管	空白管 1	空白管 2
样本	30	30		
蒸馏水		100	30	110
试剂一	480	480	480	480
试剂二	100		100	
充分混匀，37°C 孵育反应 5min				
试剂三	130	130	130	130
充分混匀，显色 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), 于 560nm 处读值,
 $\Delta A = (\text{空白 1} - \text{空白 2}) - (\text{测定} - \text{对照})$ (每个样本需做一个自身对照)。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.0362x - 0.0047$: x 为标准品浓度(nmoL), y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算:

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

亚铁氧化酶(nmol/min/g) = $[(\Delta A + 0.0047) \div 0.0362] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 184 \times (\Delta A + 0.0047) \div W \times D$

3、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟氧化 1nmol 的 Fe^{2+} 定义为一个酶活单位 (U)。

亚铁氧化酶(nmol/min/mg prot) = $[(\Delta A + 0.0047) \div 0.0362] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D$
 $= 184 \times (\Delta A + 0.0047) \div Cpr \times D$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每分钟氧化 1nmol 的 Fe^{2+} 定义为一个酶活单位 (U)。

亚铁氧化酶(nmol/min/ 10^4 cell) = $[(\Delta A + 0.0047) \div 0.0362] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$
 $= 0.37 \times (\Delta A + 0.0047) \times D$

5、按照液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟氧化 1nmol 的 Fe^{2+} 定义为一个酶活单位 (U)。

亚铁氧化酶(nmol/min/mL) = $[(\Delta A + 0.0047) \div 0.0362] \div V1 \div T \times D = 184 \times (\Delta A + 0.0047) \times D$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---加入样本体积, 0.03mL; T---反应时间, 5min;

W---样本质量, g; D---稀释倍数, 未稀释即为 1; 500---细胞数量, 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

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, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, $1.5\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 $30\mu\text{L}$ 标准品 + $100\mu\text{L}$ 蒸馏水 + $480\mu\text{L}$ 试剂一, 37°C 孵育 5min 后, 再加 $130\mu\text{L}$ 试剂三, 显色 5min 后, 于 560nm 处读值, 依据结果即可制作标准曲线。