

亚铁氧化酶（Ferroxidase）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0177W 微板法 48 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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 14mL×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 4.5mL×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：

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

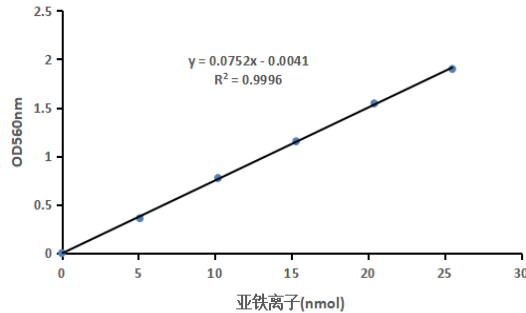
② 试剂一可解冻至室温，或于 37°C 水浴 5-10min。在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ μ L）	测定管	对照管	空白管 1	空白管 2
样本	10	10		
蒸馏水		40	10	50
试剂一	110	110	110	110
试剂二	40		40	
充分混匀，37°C 孵育反应 5min				
试剂三	40	40	40	40
充分混匀，显色 5min。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）。				

注：若有沉淀需 8000rpm 室温离心 5min，取等体积如 150μL 上清液至 96 孔板中再读值。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0752x - 0.0041$ ：x 为标准品浓度(nmolL)，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)。

$$\text{亚铁氧化酶(nmol/min/g)} = [(\Delta A + 0.0041) \div 0.0752] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 266 \times (\Delta A + 0.0041) \div W \times D$$

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)。

$$\begin{aligned} \text{亚铁氧化酶(nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0041) \div 0.0752] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D \\ &= 266 \times (\Delta A + 0.0041) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

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)。

$$\begin{aligned} \text{亚铁氧化酶(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0041) \div 0.0752] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 0.53 \times (\Delta A + 0.0041) \times D \end{aligned}$$

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)。

$$\text{亚铁氧化酶(nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0041) \div 0.0752] \div V1 \div T \times D = 266 \times (\Delta A + 0.0041) \times D$$

V---加入提取液体积，1 mL；V1---加入样本体积，0.01mL；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, 0.5, 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+ $40\mu\text{L}$ 蒸馏水+ $110\mu\text{L}$ 试剂一， 37°C 孵育 5min 后，再加 $40\mu\text{L}$ 试剂三，显色 5min 后，于 560nm 处读值，依据结果即可制作标准曲线。