

高铁还原酶 (ferric-chelate reductase, FCR) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意： 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

高铁还原酶 (ferric-chelate reductase, FCR) 催化高价铁螯合物中的 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ，在部分物种铁元素的吸收中有重要作用。

测定原理：

FCR 催化 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ， Fe^{2+} 和 ferrozine 反应显色，在 562nm 下有特征吸光值。

自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 6mL×1 瓶，4°C 避光保存；

试剂二：液体 6mL×1 瓶，4°C 避光保存；

试剂三：液体 6mL×1 瓶，4°C 保存。

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°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

- 1、 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 562nm，蒸馏水调零。
- 2、 工作液配制：将试剂一、二、三以 1:1:1 的比例混合。临用前配制，用多少配多少。
- 3、 在微量石英比色皿/96 孔板中，加入 50 μ L 样本上清和 150 μ L 工作液，混匀，记录初始吸光值 A1 和 30min 后的吸光值 A2。 $\Delta A=A2-A1$ 。

FCR 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 8.0014x + 0.0011$ ， $R^2 = 0.9997$ ；

(1) 按样本质量计算

单位定义：每 g 样本每分钟产生 1nmol Fe^{2+} -ferrozine 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{FCR (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A - 0.0011) \div 8.0014 \times 1000 \times V_{\text{标}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 4.166 \times (\Delta A - 0.0011) \div W \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 蛋白每分钟产生 1nmol Fe^{2+} -ferrozine 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FCR (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A - 0.0011) \div 8.0014 \times 1000 \times V_{\text{标}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{Cpr}) \div T = 4.166 \times (\Delta A - 0.0011) \div \text{Cpr}$$

V 样总：加入提取液体积，1 mL；V 样：反应中样品体积，50 μ L；V 标：加入标准品体积，50 μ L；T：反应时间，30min；W：样品质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；1000， μ mol 到 nmol 的转换系数。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线：y = 4.0007x + 0.0011，R² = 0.9997；y，吸光度

(1) 按样本质量计算

单位定义：每 g 样本每分钟产生 1nmolFe²⁺-ferrozine 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{FCR (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A - 0.0011) \div 4.0007 \times 1000 \times V_{\text{标}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 8.331 \times (\Delta A - 0.0011) \div W \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 蛋白每分钟产生 1nmolFe²⁺-ferrozine 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{FCR (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A - 0.0011) \div 4.0007 \times 1000 \times V_{\text{标}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 8.331 \times (\Delta A - 0.0011) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

V 样总：加入提取液体积，1 mL；V 样：反应中样品体积，50 μ L；V 标：加入标准品体积，50 μ L；T：反应时间，30min；W：样品质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；1000， μ mol 到 nmol 的转换系数。
