

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

微量法 100管/96样

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Fe³⁺还原为Fe²⁺，在部分物种铁元素的吸收中有重要作用。

测定原理：

FCR催化Fe³⁺还原为Fe²⁺，Fe²⁺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℃避光保存；

试剂二：液体6mL×1瓶，4℃避光保存；

试剂三：液体6mL×1瓶，4℃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℃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50μL样本上清和150μL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。

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

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。

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

V_{样总}：加入提取液体积，1 mL；V_样：反应中样品体积，50μL；V_标：加入标准品体积，50μL；T：反应时间，30min；W：样品质

量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; 1000, μmol 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: $y = 4.0007x + 0.0011$, $R^2 = 0.9997$; 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 μL ; V标: 加入标准品体积, 50 μL ; T: 反应时间, 30min; W: 样品质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; 1000, μmol 到nmol的转换系数。