

## 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  $Fe^{3+}$  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 $\mu$ L 样本上清和 150 $\mu$ 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。

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

V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; V 样: 反应中样品体积, 50 $\mu$ L; V 标: 加入标准品体积, 50 $\mu$ L; T: 反应时间, 30min; W: 样品质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; 1000,  $\mu$ 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:  $y = 4.0007x + 0.0011$ ,  $R^2 = 0.9997$ ; 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 1nmolFe<sup>2+</sup>-ferrozine 定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 蛋白每分钟产生 1nmolFe<sup>2+</sup>-ferrozine 定义为一个酶活力单位。

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

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。