

## 铁氧还蛋白还原酶 (Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase, FNR)

### 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:

铁氧还蛋白还原酶 (Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase, FNR) 是一种普遍存在的单分子构造的黄素酶, 主要催化 NADP(H) 和铁氧还蛋白或黄素氧还蛋白之间的可逆反应。

#### 测定原理:

FNR 催化 DCPIP 还原, 同时使 NADPH 转化为 NADP, 通过 645nm 下吸光值的降低反映 FNR 活性。

#### 需自备的仪器和用品:

酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

#### 试剂组成和配制:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂一: 液体 25mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4°C 避光保存; 临用前加入 22mL 试剂一充分溶解待用, 用不完的试剂继续 4°C 避光保存。

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 1.5mL 蒸馏水充分溶解待用, 用不完的试剂分装后 -20°C 保存。

#### 粗酶液提取:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10<sup>4</sup> 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 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 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。12000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

#### 测定步骤:

1、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 645nm。

2、样本测定

(1) 工作液配制: 临用前按照试剂二: 试剂三=190:10 的比例配制工作液, 用多少配多少;

(2) 96 孔板中依次加入 5μL 粗酶液, 195μL 工作液, 立即混合, 测定 645nm 下 1min 处吸光值 A1 与 3min 处吸光值 A2。ΔA=A1-A2。

#### FNR 活性计算:

1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟还原 1 nmol 的 DCPIP 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{FNR (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 1818 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟还原 1 nmol 的 DCPIP 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{FNR (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1818 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟还原 1 nmol 的 DCPIP 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{FNR (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3.64 \times \Delta A \end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\varepsilon$ : 2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数,  $2.2 \times 10^4$  L / mol / cm;

d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.005 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL;

T: 反应时间, 2 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。