

# 高铁还原酶（Ferric reductase,FCR）活性测定试剂盒说明书

（微板法 96 样）

## 一、产品简介：

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

高铁还原酶（FCR）可以催化  $\text{Fe}^{3+}$  还原为  $\text{Fe}^{2+}$ ， $\text{Fe}^{2+}$  再与亚铁嗪（ferrozine）生成紫红色化合物，该有色物质在 562nm 处有特征吸收峰，通过测定在 562nm 下的增加速率即可得出该酶活大小。

## 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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体×2 支	4℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，分别加 0.55mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂二	液体×1 支	4℃保存	
试剂三	粉体×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体×1 支	4℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	

## 三、所需仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、水浴锅或恒温培养箱、低温离心机、蒸馏水。

## 四、高铁还原酶（FCR）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

### 1、样本制备：

#### ① 组织样本：

取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 5min，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℃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：澄清的液体可直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测。

### 2、上机检测：

#### ① 酶标仪预热 30min，设定波长到 562nm。

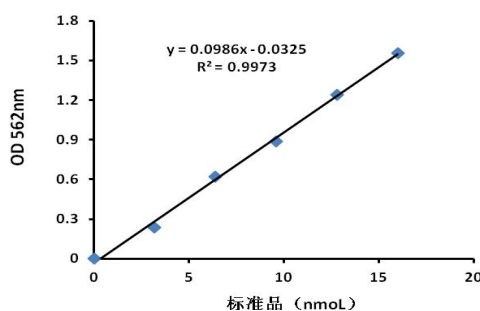
#### ② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	120
试剂五	10
充分混匀, 于波长 562nm 处读取吸光值 A1, 室温 (25℃) 孵育 30min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】若 $\Delta A$ 的值在零附近, 可增加样本加样体积 V1 (如增至 80μL, 则试剂四相应减少); 或延长反应时间 T (如增至 60min); 或增加样本取样质量 W; 则改变后的 V1、T 和 W 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算:

1、标准曲线:  $y = 0.0986x - 0.0325$ : x 为标准品摩尔质量(nmol), y 为 $\Delta A$ 。



2、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每分钟催化生成 1nmol Fe<sup>2+</sup> 定义为一个酶活单位 (U)。

FCR (nmol/min/g 鲜重) =  $[(\Delta A + 0.0325) \div 0.0986] \div (W \times V1 \div V) \div T = 8.5 \times (\Delta A + 0.0325) \div W$

3、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化生成 1nmol Fe<sup>2+</sup> 定义为一个酶活单位 (U)。

FCR (nmol/min/mg prot) =  $[(\Delta A + 0.0325) \div 0.0986] \div (V1 \times Cpr) \div T = 8.5 \times (\Delta A + 0.0325) \div Cpr$

4、按照液体体积计算:

单位定义: 每毫升液体每分钟催化生成 1nmol Fe<sup>2+</sup> 定义为一个酶活单位 (U)。

FCR (nmol/min/mL) =  $[(\Delta A + 0.0325) \div 0.0986] \div V1 \div T = 8.5 \times (\Delta A + 0.0325) \div Cpr$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.04mL;

T---反应时间, 30min;

W---样本质量, g;

500---细菌/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 标准品母液 (15μmol/mL): 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度: 0, 0.08, 0.16, 0.24, 0.32, 0.4μmol/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 2 40μL 标准品+10μL 试剂三+150μL 试剂四, 混匀, 室温静置 5min 后于 562nm 处读取吸光值 A, 依据结果即可制作标准曲线。