

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

(货号: ADS-W-QT022 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  $Fe^{3+}$  还原为  $Fe^{2+}$ , 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  $Fe^{3+}$  还原为  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  再与亚铁啉 (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°C保存	
试剂一	粉体 2 支	4°C保存	使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°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂二	液体 1 支	4°C保存	
试剂三	粉体 1 支	4°C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°C保存	
试剂五	液体 1 支	4°C保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4°C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°C×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°C 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°C), 在 96 孔板中依次加入:

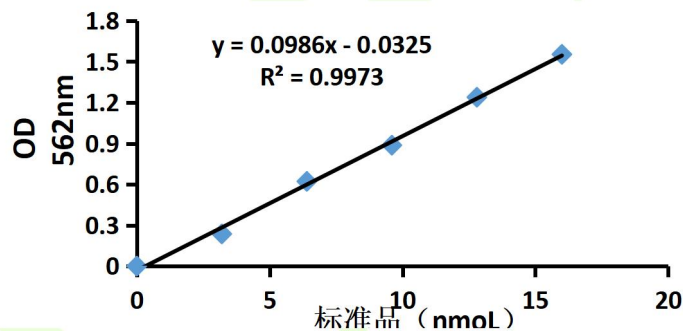
试剂名称 (μL)	测定管
-----------	-----

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 80 $\mu$ L，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 (30 $\mu$ mol/mL)；把母液用蒸馏水稀释成以下浓度：0, 1.875, 3.75, 7.5, 15, 30 $\mu$ mol/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 2 40 $\mu$ L 标准品+10 $\mu$ L 试剂三+150 $\mu$ L 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。