

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 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 2 支	4℃ 保存	每支: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 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	-20℃避光保存	
试剂三	粉体 1 支	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
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℃避光保存	

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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、检测步骤：

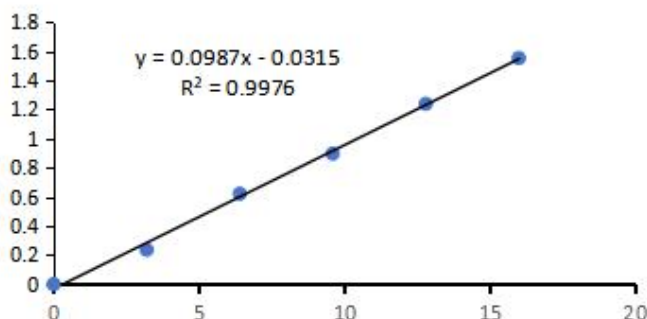
- ① 酶标仪预热 30min（等仪器过自检程序亦可），设定波长到 562nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（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 ΔA 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： $y = 0.0987x - 0.0315$ ；x 为标准品摩尔质量(nmolL)，y 为 ΔA 。



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^{2+} 定义为一个酶活单位（U）。

$$FCR (nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0315) \div 0.0987] \div (W \times V1 \div V) \div T = 8.44 \times (\Delta A + 0.0315) \div W$$

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^{2+} 定义为一个酶活单位（U）。

$$FCR (nmol/min/mg \text{ prot}) = [(\Delta A + 0.0315) \div 0.0987] \div (V1 \times Cpr) \div T = 8.44 \times (\Delta A + 0.0315) \div Cpr$$

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^{2+} 定义为一个酶活单位（U）。

$$FCR (nmol/min/mL) = [(\Delta A + 0.0315) \div 0.0987] \div V1 \div T = 8.44 \times (\Delta A + 0.0315)$$

5、按细菌/细胞数量计算：

单位定义：每 10^4 个细胞每分钟催化生成 1nmol Fe^{2+} 定义为一个酶活单位（U）。

$$FCR (nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0315) \div 0.0987] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.017 \times (\Delta A + 0.0315)$$

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 标曲为非必做实验, 用户可根据实验需求制作标曲, 亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 标准品母液浓度为 30 μ mol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 1.875, 3.75, 7.5, 15, 30 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 3 标品稀释参照表如下:

标品浓度 μ mol/mL	0	1.875	3.75	7.5	15	30
标品母液 uL	0	25	50	100	200	400
蒸馏水 uL	400	375	350	300	200	0
各标准管混匀待用。						

- 4 依据如下的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂组分 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	40	
蒸馏水		40
试剂三	10	10
试剂四	150	150
充分混匀, 于波长 562nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		