

## 高铁还原酶 (ferric-chelate reductase, FCR) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

**注 意：** 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<sup>3+</sup>还原为 Fe<sup>2+</sup>，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<sup>3+</sup>还原为 Fe<sup>2+</sup>，Fe<sup>2+</sup>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℃避光保存；

试剂二：液体 6mL×1 瓶，4℃避光保存；

试剂三：液体 6mL×1 瓶，4℃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℃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 50μL 样本上清和 150μL 工作液，混匀，记录初始吸光值 A1 和 30min 后的吸光值 A2。ΔA=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<sup>2</sup> = 0.9997；

(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。

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

(2) 按样本蛋白浓度计算

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

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

---

$$=4.166 \times (\Delta A - 0.0011) \div \text{Cpr}$$

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<sup>2</sup> = 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。

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

(2) 按样本蛋白浓度计算

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

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

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。

---