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 Fe3+还原为 Fe2+，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^{3+}还原为 Fe^{2+}，Fe^{2+}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：$y = 8.0014x + 0.0011$，$R^2 = 0.9997$；

（1）按样本质量计算

单位定义：每 g 样本每分钟产生 1nmolFe^{2+}-ferrozine 定义为一个酶活力单位。

FCR（nmol/min/g 鲜重）=（ΔA-0.0011）÷ 8.0014×1000×V 标÷(V 样÷V 样总×W)÷T

= 4.166×（ΔA-0.0011）÷W

（2）按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 蛋白每分钟产生 1nmolFe^{2+}-ferrozine 定义为一个酶活力单位。

FCR（nmol/min/mg prot）=（ΔA-0.0011）÷8.0014×1000×V 标÷(V 样÷V 样总×Cpr)÷T =4.166×（ΔA-0.0011）÷Cpr

V 样总：加入提取液体积，1 mL；V 样：反应中样品体积，50μL；V 标：加入标准品体积 ，50μL；T：反应时间，30min；W：样品质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；1000，μmol 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^2 = 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^{2+}-ferrozine 定义为一个酶活力单位。

FCR（nmol/min/g 鲜重）=（ΔA-0.0011）÷4.0007×1000×V 标÷(V 样÷V 样总×W)÷T

=8.331×（ΔA-0.0011）÷W

（2）按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 蛋白每分钟产生 1nmolFe^{2+}-ferrozine 定义为一个酶活力单位。

FCR（nmol/min/mg prot）=（ΔA-0.0011）÷4.0007×1000×V 标÷(V 样÷V 样总×W)÷T

=8.331×（ΔA-0.0011）÷Cpr

V 样总：加入提取液体积，1 mL；V 样：反应中样品体积，50μL；V 标：加入标准品体积 ，50μL；T：反应时间，30min；W：样品质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；1000，μmol 到 nmol 的转换系数。