

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

(货号: G0147F 分光法 48 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 60mL×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 1.1mL 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×2 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 2.4mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 25mL×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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、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:

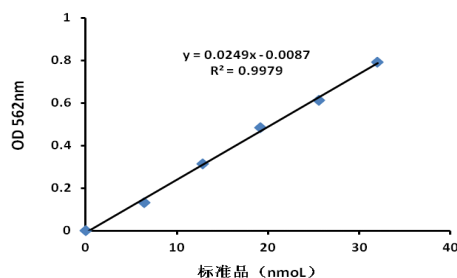
① 可见分光光度计预热 30min, 设定波长到 562nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	160
试剂一	40
试剂二	40
试剂三	40
试剂四	480
试剂五	40
充分混匀, 于波长 562nm 处读取吸光值 A1, 室温 (25°C) 孵育 30min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.0249x - 0.0087$: x 为标准品摩尔质量(nmol), 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)。

$FCR (nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.0249] \div (W \times V1 \div V) \div T = 8.4 \times (\Delta A + 0.0087) \div W$

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)。

$FCR (nmol/min/mg \text{ prot}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.0249] \div (V1 \times Cpr) \div T = 8.4 \times (\Delta A + 0.0087) \div Cpr$

4、按细胞数量计算:

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)。

$FCR (nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.0249] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 8.4 \times (\Delta A + 0.0087) \div 500$

5、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)。

$FCR (nmol/min/mL) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.0249] \div V1 \div T = 8.4 \times (\Delta A + 0.0087) \div Cpr$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.16mL;

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 (15 $\mu\text{mol/mL}$); 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度: 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际来调整浓度。
- 2 160 μL 标准品 + 40 μL 试剂三 + 600 μL 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。