



高铁还原酶活性检测试剂盒

FCR Assay Kit

微量法

产品编号: AK471M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK471-A	6mL×1 瓶	4℃避光保存
AK471-B	6mL×1 瓶	4℃避光保存
AK471-C	6mL×1 瓶	4℃保存
AK471-标准品	粉剂×1 支	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 高铁还原酶 (ferric-chelate reductase, FCR) 催化高价铁螯合物中的 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ，在部分物种铁元素的吸收中有重要作用。

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、微量玻璃比色皿/96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、浓硫酸 (>95%，AR)、冰和蒸馏水。

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 AK471-A:B:C 以 1:1:1 的比例混合。临用前配制，用多少配多少。
3. 标准品：临用前加入 0.71mL 蒸馏水和 10uL 浓硫酸，配制成 50umol/mL Fe^{2+} 标准液。溶解好的标准品 2-8℃ 可以保存 2 周。
4. 62.5nmol/mL 标准溶液的配制：临用前取 50uL 50umol/mL Fe^{2+} 标准液和 950uL 蒸馏水混合配制 2.5umol/mL 标准溶液；再吸取 25uL 2.5umol/mL (2500nmol/mL) 和 975uL 蒸馏水混合配制成 62.5nmol/mL 标准溶液备用。
5. 标准管测定：吸取 50uL 62.5nmol/mL Fe^{2+} 标准液，加入 150uL 显色剂，充分混匀，测定 562nm 下的吸光度，记为 A 标准，此时 Fe^{2+} 终浓度为 15.625nmol/mL，标准管只需做 1-2 次。
6. 空白管测定：吸取 50uL 蒸馏水，加入 150uL 显色剂，充分混匀，测定 562nm 下的吸光度，记为 A 空白，计算 AA 标准=A 标准-A 空白，空白管只需做 1-2 次。
7. 样本测定：在微量玻璃比色皿/96 孔板中加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
样本	50
工作液	150
混匀，记录初始吸光值 A1 和 30min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta\text{A}=\text{A2}-\text{A1}$ 。	

FCR 活性计算公式:

1. 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白在每 mL 体系中每分钟生成 1nmol Fe^{2+} 定义为一个酶活力单位。

FCR 活性($\text{U}/\text{mg prob}$) = $\Delta\text{A} \times \text{C} \text{ 标} \div \Delta\text{A} \text{ 标准} \times \text{V} \text{ 总} \div (\text{Cpr} \times \text{V} \text{ 样}) \div \text{T} = 2.083 \times \Delta\text{A} \div \Delta\text{A} \text{ 标准} \div \text{Cpr}$

2. 按样本质量计算:

单位的定义: 每 g 组织在每 mL 体系中每分钟生成 1nmol Fe²⁺定义为一个酶活力单位。

FCR 活性(U/g 质量) = $\Delta A \times C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2.083 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$

注: C 标: Fe²⁺标准液最终浓度, 15.625nmol/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 50uL=0.05mL; V 提取: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间 30min;, W: 样本质量, g。