



高铁螯合物还原酶(FCR)活性检测试剂盒(微量法)

中文名称：**高铁螯合物还原酶(FCR)活性检测试剂盒(微量法)**

英文名称：ATP Content Assay Kit(WST-1 Method)

产品包装：盒装

产品规格：100T/96S

储存条件：2-8°C

检测方法：微量法

有效期：6个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 6 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 6 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

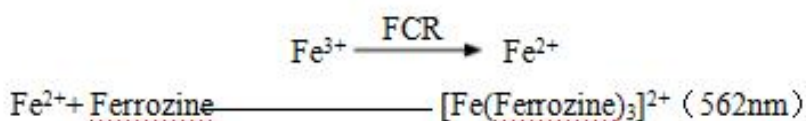
1、显色液：临用前根据样本数量按照试剂一：试剂二：试剂三=50 μ L：50 μ L：50 μ L(150 μ L, 1T)的比例配制显色液，充分混匀，现配现用。

2、标准品：临用前加入 0.71mL 蒸馏水和 10 μ L 浓硫酸，配制成 50 μ mol/mLFe²⁺标准液。溶解好的标准品 2-8°C可以保存 2 周。

3、62.5nmol/mL 标准溶液的配制：临用前取 50 μ L50 μ mol/mLFe²⁺标准液和 950 μ L 蒸馏水混合配制成 2.5 μ mol/mL 标准溶液；再吸取 25 μ L2.5 μ mol/mL(2500nmol/mL)和 975 μ L 蒸馏水混合配制成 62.5nmol/mL 标准溶液备用。

产品说明:

双子叶植物和非禾本科单子叶植物采用铁螯合还原反应的高效活化和吸收机制从土壤中提取铁。三价铁还原为二价铁后才能被植物吸收利用。在铁充足时,植物根部的三价铁氧化还原酶将 Fe(III)-螯合物中的铁还原并将还原所得 Fe²⁺ 转运通过细胞质膜进入根细胞内。高铁螯合物还原酶 (Ferricchelatereductase, FCR, EC1.16.1.7) 催化 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺, Fe²⁺ 和菲洛嗪形成紫色络合物, 在 562nm 下有特征吸收峰。



注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、分析天平、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、浓硫酸(95%-99%AR)、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理(可适当调整待测样本量)

1. 组织样本: 按质量(g):提取液体积(mL)1:5~10 比例加入提取液(建议称取 0.1g 样本, 加入 1.0mL 提取液), 冰浴匀浆后, 于 4°C, 8000g, 离心 10min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。

2. 液体样本: 直接测定。若液体有浑浊则离心取上清测定。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 562nm, 可见分光光度计用蒸馏水调零。2. 显色液临用前平衡至常温。



3. 标准管测定

吸取 50 μ L 62.5nmol/mL Fe²⁺ 标准液，加入 150 μ L 显色剂，充分混匀，测定 562nm 下的吸光度，记为 A 标准，此时 Fe²⁺ 终浓度为 15.625nmol/mL，标准管只需做 1-2 次。

4. 空白管测定

吸取 50 μ L 蒸馏水，加入 150 μ L 显色剂，充分混匀，测定 562nm 下的吸光度，记为 A 空白，计算 ΔA 标准 = A 标准 - A 空白，空白管只需做 1-2 次。

5. 操作表：(在微量玻璃比色皿或 96 孔板中以下试剂)

试剂名称(μ L)	测定管
样本	50
显色液	150

立即充分混匀后于微量玻璃比色皿/96 孔板，562nm 处测定 10s 时的吸光值 A1，常温反应 30min，测定 30min 10s 时的吸光值 A2，记录 562nm 下 10s 时吸光值 A1 和 30min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

三、高铁螯合物还原酶(FCR)活性计算

(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 Fe²⁺ 定义为一个酶活力单位。FCR 活性(U/mg prot) = $\Delta A \times C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2.083 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$

(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) = $\Delta A \times C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2.083 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times C_{\text{标}}$

标准 $\div W$ C_标: Fe²⁺ 标准液浓度，15.625nmol/mL；V_{反总}: 反应体系总体积，0.2mL；

C_{pr}: 上清液蛋白浓度，mg/mL；V_样: 加入反应体系中上清液体积，50 μ L = 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。



注意事项:

如果 ΔA 小于 0.010 或测定管吸光值接近空白管, 可以增加样本量或者延长反应时间后再进行测定; 如果 ΔA 大于 1 或者 A_1 大于 1, 建议将样本上清用提取液适当稀释后再进行测定。

注意同步修改计算公式。

实验实例:

1、称取 0.1214g 樱桃番茄, 加入提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.665 - 0.127 = 0.538$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.525 - 0.083 = 0.442$, 带入公式计算: $\text{FCR 活性(U/g 质量)} = 2.083 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 20.885 \text{U/g 质量}$ 。

2、称取 0.1002g 闽南叶片, 加入提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.188 - 0.104 = 0.084$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.525 - 0.083 = 0.442$, 带入公式计算: $\text{FCR 活性(U/g 质量)} = 2.083 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 3.951 \text{U/g 质量}$ 。