

二氢黄酮醇还原酶（Dihydro flavonol reductase, DFR）试剂盒说明书

微量法 100管/48样

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

二氢黄酮醇还原酶是类黄酮合成途径中的一个关键酶，在决定植物的花色、叶色、果色和其他经济器官的色泽及其营养品质方面起着重要作用。

测定原理：

二氢黄酮醇还原酶作用于二氢槲皮素产生儿茶素，可与香草醛缩合形成红色化合物，在500nm处有特征吸收峰。

自备仪器和用品：

研钵、低温离心机、震荡仪、氮吹仪、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、水浴锅、无水乙醇、乙酸乙酯。

试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体12mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体1.5mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加2mL蒸馏水溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

试剂四：液体30mL×1瓶，4℃避光保存。

酶液提取

组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），进行冰浴匀浆。10000g，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

测定操作表

1、分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至500nm。

2、操作表

	对 照 管	测定管
酶液（ μ L）	40	40
试剂一（ μ L）	140	120
试剂二（ μ L）		20
试剂三（ μ L）	20	20

混匀，30℃反应30min		
乙酸乙酯（ μL ）	200	200
37℃震荡10min，取上层溶液，N2吹干		
无水乙醇（ μL ）	100	100
充分震荡		
试剂四（ μL ）	300	300
混匀，25℃静置10min，于微孔板/96孔板中测定500nm处吸光值A。分别记为A对照管和A测定管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$		

二氢黄酮醇还原酶（Dihydro flavonol reductase, DFR）试剂盒说明书酶活性计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 0.0184x + 0.0002$ ， $R^2 = 0.999$

(1) 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：在30℃，pH7.5条件下，每毫克蛋白每分钟分解二氢槲皮素产生1mmol儿茶素所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{DFR活性 (mmol/min/mg prot)} &= (\Delta A - 0.0002) \div 0.0184 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \div 2 \\ &= 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义：在30℃，pH7.5条件下，每克组织每分钟分解二氢槲皮素产生1mmol儿茶素所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{DFR活性 (mmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A - 0.0002) \div 0.0184 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \div 2 \\ &= 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div W \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，1mL； $V_{\text{样}}$ ：反应体系中样本体积，0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL； W ，样本质量，g； T ：反应时间，30min

b. 用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 0.0092x + 0.0002$ ， $R^2 = 0.999$

(1) 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：在30℃，pH7.5条件下，每毫克蛋白每分钟分解二氢槲皮素产生1mmol儿茶素所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{DFR活性 (mmol/min/mg prot)} &= (\Delta A - 0.0002) \div 0.0092 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \div 2 \\ &= 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义：在30℃，pH7.5条件下，每克组织每分钟分解二氢槲皮素产生1mmol儿茶素所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{DFR活性 (mmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A - 0.0002) \div 0.0092 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \div 2$$

$$= 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div W$$

V反总: 反应总体积, 1mL; V样: 反应体系中样本体积, 0.1mL; V样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W, 样本质量, g; T: 反应时间, 30min

www.pyram.cn