

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

分光光度法 50 管/24 样

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:

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。

组成:

产品名称	AO019-50T/24S	Storage
提取液: 液体	50ml	4°C
试剂一: 液体	30ml	4°C
试剂二: 液体	3ml	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂四: 液体	40ml×2	4°C避光
说明书	一份	

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4°C保存。临用前加 5ml 蒸馏水溶解; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。

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、1ml 玻璃比色皿、水浴锅、无水乙醇、乙酸乙酯。

酶液提取:

1. 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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 液体: 直接检测。

测定操作表

	对照管	测定管
酶液 (μl)	200	200

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



试剂一 (μl)	700	600
试剂二 (μl)		100
试剂三 (μl)	100	100
混匀, 30°C反应 30min		
乙酸乙酯 (μl)	1000	1000
37°C震荡 10min, 取上层溶液, N2 吹干		
无水乙醇 (μl)	500	500
充分震荡		
试剂四(μl)	1500	1500
混匀, 25°C静置 10min, 于 1ml 玻璃比色皿测定 500nm 处吸光值 A。 分别记为 A 对照管和 A 测定管, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$		

酶活性计算公式:

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°C, 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°C, 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。

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

(3) 按液体体积计算

酶活性定义: 在 30°C, pH7.5 条件下, 每毫升液体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。

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

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

