

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

### 微量法 100T/48S

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	AO020-100T/48S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	12ml	4°C
试剂二: 液体	1.5ml	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂四: 液体	30ml	4°C避光
说明书	一份	

试剂三: 临用前加 2ml 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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、水浴锅、无水乙醇、乙酸乙酯。

#### 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°C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 (μl)	40	40
试剂一 (μl)	140	120
试剂二 (μl)		20
试剂三 (μl)	20	20
混匀, 30°C反应 30min		
乙酸乙酯 (μl)	200	200
37°C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°C静置 10min, 于微量石英比色皿/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, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$		

### 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°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。

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

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

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°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。

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

(2) 按照样本质量计算



**酶活性定义：**在 30°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。

$$\text{DFR 活性 (mmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A - 0.0002) \div 0.0092 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \div 2$$
$$= 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div W$$

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

