

## 花青素还原酶 (anthocyanidin reductase, ANR) 试剂盒说明书

### 微量法 100T/96S

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:

花青素还原酶是黄酮合成途径中的关键酶, 在植物体内起非常重要的调控作用, 对花青素还原酶的调控机制研究有利于从基因水平改变植物的品质。

#### 测定原理:

花青素还原酶在 NADPH 存在的条件下作用于飞燕草色素转变为表没食子儿茶素和 NADP, 使反应体系在 340nm 处的吸光值下降, 吸光值下降速率反应了花青素还原酶的活性。

#### 组成:

产品名称	AO022-100T/96S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	20ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	4°C避光
试剂三: 粉剂	1 瓶	4°C避光
试剂四: 粉剂	1 瓶	4°C避光
说明书	一份	

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4°C避光保存。临用前加 1ml 蒸馏水溶解; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。

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

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4°C避光保存。临用前加 1ml 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:

天平、研钵、低温离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、蒸馏水。

#### 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. 培养液等液体: 直接检测。

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



### 测定操作表:

试剂名称	测定管
试剂一 (μl)	150
试剂二 (μl)	10
酶液 (μl)	20
试剂三 (μl)	10
试剂四 (μl)	10

充分混匀, 于微量石英比色皿/96孔板测定 340 处吸光值 A1, 然后在 40°C温育 20min 后, 再测定 340nm 处吸光值 A2,  $\Delta A = A1 - A2$

### 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

(1) 按照蛋白浓度计算

**酶活性定义:** 在 40°C, pH6.5 条件下, 每毫克蛋白每分钟催化 1nmolNADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ANR 活性 (nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 80.39 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

**酶活性定义:** 在 40°C, pH6.5 条件下, 每克组织每分钟催化 1nmolNADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ANR 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 80.39 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按液体体积计算

**酶活性定义:** 在 40°C, pH6.5 条件下, 每毫升液体每分钟催化 1nmolNADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ANR 活性 (nmol/min/ml)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 80.39 \times \Delta A \end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.2ml;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ; d: 比色皿光径, 1cm;  
V 样: 加入样本体积, 0.02ml; V 样总: 加入提取液体积, 1ml; T: 反应时间, 20min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/ml; W: 样本质量, g

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按照蛋白浓度计算

**酶活性定义:** 在 40°C, pH6.5 条件下, 每毫克蛋白每分钟催化 1nmolNADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ANR 活性 (nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 160.78 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

**酶活性定义:** 在 40°C, pH6.5 条件下, 每克组织每分钟催化 1nmolNADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ANR 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

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



$$= 160.78 \times \Delta A \div W$$

(3) 按液体体积计算

**酶活性定义：**在 40°C，pH6.5 条件下，每毫升液体每分钟催化 1nmolNADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ANR 活性 (nmol/min/ml)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 160.78 \times \Delta A \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，0.2ml； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，0.5cm；

V 样：加入样本体积，0.02ml；V 样总：加入提取液体积，1ml；T：反应时间，20min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/ml；W：样本质量，g

