

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

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。

### 需自备的仪器和用品

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、浓盐酸。

### 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（ $\mu\text{L}$ ）	40	40
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）	120	120
试剂二（ $\mu\text{L}$ ）		20
试剂三（ $\mu\text{L}$ ）	20	20
混匀，30℃反应 30min		
乙酸乙酯（ $\mu\text{L}$ ）	200	200
37℃震荡 10min，取上层溶液，N2 吹干		
无水乙醇（ $\mu\text{L}$ ）	100	100
充分震荡		
试剂四（ $\mu\text{L}$ ）	300	300
混匀，25℃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， $\Delta A = A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}$		

### 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：粉剂×1 瓶，4℃避光保存，临用前加入 30mL 浓盐酸溶解待用；用不完的试剂 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。

#### 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。

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

###### (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。

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

$V_{\text{反总}}$ ：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； $C_{\text{pr}}$ ：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。

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

(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<sub>反总</sub>：反应总体积，1mL；V<sub>样</sub>：反应体系中样本体积，0.1mL；V<sub>样总</sub>：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