

## 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°C 反应 30min		
乙酸乙酯 ( $\mu\text{L}$ )	200	200
37°C 震荡 10min, 取上层溶液, N <sub>2</sub> 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°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, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$		

#### 试剂组成和配制:

提取液: 液体 100mL $\times$ 1 瓶, 4°C 保存。

试剂一: 液体 12mL $\times$ 1 瓶, 4°C 保存。

试剂二: 液体 1.5mL $\times$ 1 瓶, 4°C 保存。

试剂三: 粉剂 $\times$ 1 瓶, 4°C 保存, 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。

试剂四: 粉剂 $\times$ 1 瓶, 4°C 避光保存, 临用前加入 30mL 浓盐酸溶解待用; 用不完的试剂 4°C 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°C 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。

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

(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。

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

V 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℃, 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。

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

(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