

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

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、1mL 玻璃比色皿、水浴锅、无水乙醇、乙酸乙酯，浓盐酸。

试剂组成和配制

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 3mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 5mL 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×2 瓶，4℃ 避光保存，临用前每瓶加入 40mL 浓盐酸溶解待用；用不完的试剂 4℃ 避光保存。

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℃ 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
试剂一（ μL ）	700	600
试剂二（ μL ）		100
试剂三（ μL ）	100	100
混匀，30℃ 反应 30min		
乙酸乙酯（ μL ）	1000	1000
37℃ 震荡 10min，取上层溶液，N ₂ 吹干		
无水乙醇（ μL ）	500	500
充分震荡		
试剂四（ μL ）	1500	1500
混匀，25℃ 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℃，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℃，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℃，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