



二氢黄酮醇还原酶检测试剂盒

DFR Assay Kit

微量法

产品编号: AK365M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES365	50mL×1 瓶	4℃保存;
AK365-A	15mL×1 瓶	4℃保存;
AK365-B	0.5mL×1 瓶	4℃保存;
AK365-C	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加 2mL 蒸馏水溶解; 剩余试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
AK365-D	40mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK365-标准品	粉剂×1 支	4℃保存; 临用前加入 1 mL 无水乙醇溶解, 配成 10 mmol/L 溶液备用。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

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。

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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、天平、研钵、低温离心机、震荡仪、氮吹仪、水浴锅、无水乙醇、乙酸乙酯。

酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g): ES365 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES365), 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。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 500nm。
2. 将 10 mmol/L 标准液用无水乙醇稀释为 1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1mmol/L 的标准溶液备用。
3. 操作表:

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
酶液	40	40		
AK365-A	140	120		
AK365-B		20		
AK365-C	20	20		
混匀, 30℃反应 30min				
乙酸乙酯	200	200		
37℃震荡 10min, 取上层溶液, N ₂ 吹干				

标准溶液			100	
无水乙醇	100	100		100
充分震荡				
AK365-D	300	300	300	300
混匀，静置 10min，于微量玻璃比色皿/96 孔板中测定 500nm 处吸光值 A。分别记为 A 对照管、A 测定管、A 空白管和 A 标准管。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。 注：每一个测定管需设定一个对照管，空白和标准曲线只需检测 1-2 次。				

酶活性计算公式

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x，mmol/L）和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ （y， $\Delta A_{\text{标准}}$ ），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ （y， $\Delta A_{\text{测定}}$ ）带入公式计算样本浓度（x，mmol/L）。

2. 酶活性的计算

（1）按蛋白浓度计算

酶活定义：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。

$$\text{DFR 活性(U/mg prot)} = x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \div 2 = 0.167x \div C_{\text{pr}}$$

（2）按样本质量计算

酶活定义：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。

$$\text{DFR 活性(U/g 鲜重)} = x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \div 2 = 0.167x \div W$$

注：V 反总：反应总体积，0.2mL；V 样：反应体系中样本体积，0.04mL；V 样总：加入 ES365 体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W，样本质量，g；T：反应时间，30min。