

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，N2 吹干		

	对照管	测定管
无水乙醇 (μL)	500	500
充分震荡		
试剂四(μL)	1500	1500
混匀, 25°C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°C, 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。

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

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 30°C, 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。

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

(3) 按液体体积计算

酶活性定义: 在 30°C, 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。

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

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; C_{pr}: 样本蛋白浓度, mg/mL; W, 样本质量, g; T: 反应时间, 30min