

**二氢黄酮醇还原酶 (Dihydro flavonol reductase, DFR)****试剂盒说明书****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。

**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。

**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 (μL)	40	40
试剂一 (μL)	140	120
试剂二 (μL)		20
试剂三 (μL)	20	20
混匀，30℃反应 30min		
乙酸乙酯 (μL)	200	200

	对照管	测定管
37°C 震荡 10min, 取上层溶液, N2 吹干		
无水乙醇 (μL)	100	100
充分震荡		
试剂四(μL)	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, △A = A 测定管 - A 对照管		

#### 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°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。

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

$$= 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div W$$

$V_{\text{反总}}$ : 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°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。

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

$$= 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 30°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。

$$\text{DFR 活性 (mmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A - 0.0002) \div 0.0092 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \div 2$$

$$= 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div W$$

$V_{\text{反总}}$ : 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