



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	100mL×1瓶	4℃保存;
AK365-A	12mL×1瓶	4℃保存;
AK365-B	1.5mL×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	30mL×1瓶	4℃避光保存;
AK365-标准品	粉剂×1支	临用前加入 1 mL 无水乙醇溶解, 配成 10 mg/mL 溶液备用; 4℃保存

※ 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、微量石英比色皿/96 孔板、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。
1. 将 10 mg/mL 标准液用无水乙醇稀释为 0.25、0.2、0.15、0.1、0.05、0.25、0.01mg/mL 的标准溶液备用。
2. 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		
标准溶液				
蒸馏水				
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, N2 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, 25℃ 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、A 测定管、A 空白管和 A 标准管。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。(空白需检测 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, mg/mL) 和吸光度 ΔA 标准 (y, ΔA 标准), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA 测定 (y, ΔA 测定) 带入公式计算样本浓度 (x, mg/mL)。

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。

$$\text{DFR 活性}(\text{mmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \div 2 = 0.083x \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{DFR 活性}(\text{mmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \div 2 = 0.083x \div W$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.04mL; $V_{\text{样总}}$: 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。