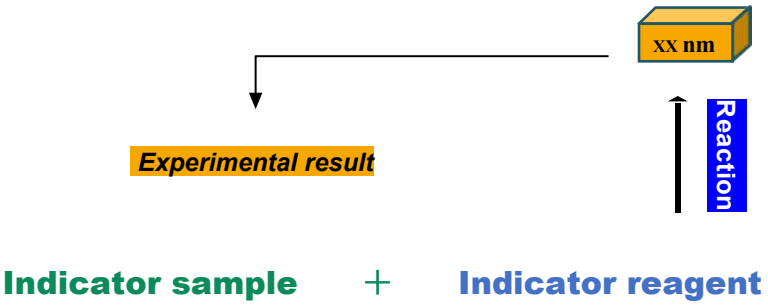
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

二氢黄酮醇还原酶(Dihydro flavonol reductase ，DFR) 试剂盒说明书
分光光度法

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。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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		
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，△A=A 测定管-A 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。

DFR 活性(mmol/min/mg prot) = （△A-0.0002）÷0.0184×V 反总÷（V 样×Cpr）÷T÷2

= 9.06×（△A-0.0002）÷Cpr

（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。

DFR 活性(mmol/min/g 鲜重) = （△A-0.0002）÷0.0184×V 反总÷(V 样×W÷V 样总）÷T÷2 =

9.06×（△A-0.0002）÷W

（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。

DFR 活性(mmol/min/mL) = （△A-0.0002）÷0.0184×V 反总÷V 样÷T÷2

= 9.06×（△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；Cpr：样本蛋白浓度， mg/mL；W ，样本质量， g；T：反应时间，30min