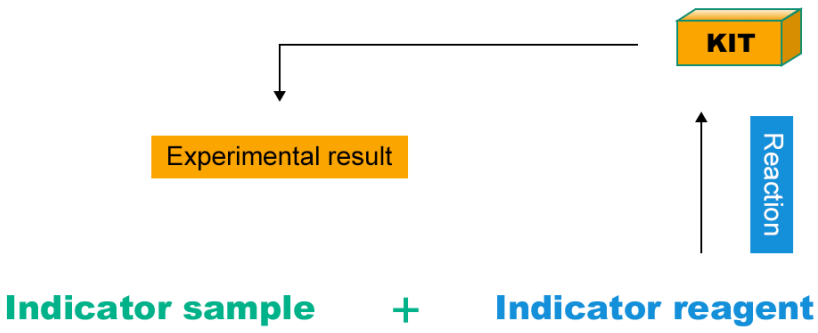
上海茁彩生物科技有限公司

ZCIBIO Technology Co.,Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0944 Size：100T/48S

二氢黄酮醇还原酶 (DFR)检测试剂盒说明书

微量法

***正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定**

一、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。

二、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。

三、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。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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

五、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。

六 、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
37℃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℃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		

七、酶活性计算公式

- 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℃， 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

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

- 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℃， 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)÷0.0092×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)÷0.0092×V 反总÷(V 样×W÷V 样总)÷T ÷2 =9.06×(△A-0.0002) ÷W

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