

花青素还原酶 (anthocyanidin reductase, ANR) 试剂盒说明书

(货号: G1006W48 微板法 48 样)

一、产品简介:

花青素还原酶 (ANR) 参与调控花青素的含量水平以及原花青素的形成, 是原花青素单体生物合成过程中关键酶之一, 在花青素积累过程中具有重要的调节作用。

花青素还原酶 (ANR) 在 NADPH 存在下使飞燕草色素转变为表没食子儿茶素和 NADP⁺, 通过检测反应体系在 340nm 处的吸光值下降速率即可得出花青素还原酶 (ANR) 活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20°C 保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×2 支	-20°C 保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 每支分别加 0.3mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后 -20°C 保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂三	液体 15mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	粉剂 μg×1 支	-20°C 避光保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 0.6mL 乙醇溶解备用, 用不完的试剂分装后 -20°C 避光保存, 禁止反复冻融。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、无水乙醇、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰。

四、花青素还原酶 (ANR) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本: 称取约 0.1g 组织样本, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 液体样本: 若液体澄清可直接检测; 若浑浊则 12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清置冰上待测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 或可于水浴锅 (25°C) 中孵育 15-25min。

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	150
340nm, 室温 (25°C) 孵育 5min	
试剂四	10
充分混匀, 立即于 340nm 处读取吸光值 A1, 后于 40°C 温育 20min 后, 再读取吸光值 A2, ΔA=A1-A2。	

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：40℃条件下，每毫克组织蛋白每分钟氧化 1nmolNADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ANR 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_1 \times C_{pr}) \div T = 160.8 \times \Delta A \div C_{pr}$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：40℃条件下，每克组织每分钟氧化 1nmolNADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ANR 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 160.8 \times \Delta A \div W$$

3、按液体体积计算：

酶活定义：40℃条件下，每毫升液体每分钟氧化 1nmolNADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ANR 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 160.8 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积， 2×10^{-4} L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；

W---样本质量，g；

T---反应时间，20min；

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL)，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。