

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

（货号：G1006W96 微板法 96 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 110mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂一 | 粉剂 mg×1 支 | -20℃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℃保存 | 用前甩几下或离心使粉剂落入底部，每支分别加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。 |
| 试剂三 | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂四 | 粉剂 μg×1 支 | -20℃避光保存 | 用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1.1mL 乙醇溶解备用，用不完的试剂分装后-20℃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，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

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℃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℃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℃），或可于水浴锅（25℃）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℃）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, $\Delta A=A1-A2$ 。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 40°C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。

$$\text{ANR 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 160.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

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

$$\text{ANR 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 160.8 \times \Delta A \div W$$

3、按液体体积计算:

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

$$\text{ANR 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 160.8 \times \Delta A$$

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。