

二氢黄酮醇还原酶(dihydroflavonol 4-reductase,DFR)试剂盒说明书

(G1008F 分光法 24 样)

一、产品简介:

二氢黄酮醇还原酶 (DFR, EC 1.1.1.219) 是花色苷合成代谢中的一个关键酶,负责将 3 种二氢黄酮醇还原成无色花色素。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。

二氢黄酮醇还原酶 (DFR) 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 处有特征吸收峰进而得出 DFR 的酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉体×3 支	4°C 保存	临用前离心或甩几下使试剂落入底部,每支再加 0.5mL 乙醇充分溶解,4°C 保存。
试剂三	粉体×1 支	-20°C 保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部,分别加 1.5mL 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。
试剂四	粉体×1 瓶	4°C 保存	临用前离心或甩几下使试剂落入底部,再加 36mL 盐酸充分溶解,4°C 保存。
标准品	粉体×1 支	4°C 保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、乙酸乙酯、无水乙醇、冰。

四、二氢黄酮醇还原酶 (DFR) 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:

称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。12000rpm 4°C 离心 15min,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 的比例提取。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上,温度设定 25°C,调节波长至 500nm。

② 试剂放在 40°C 水浴 5min;

③ 按照下表在 EP 管中依次加入试剂:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	325	375
试剂二	50	
试剂三	25	25
混匀, 40°C 反应 30min		

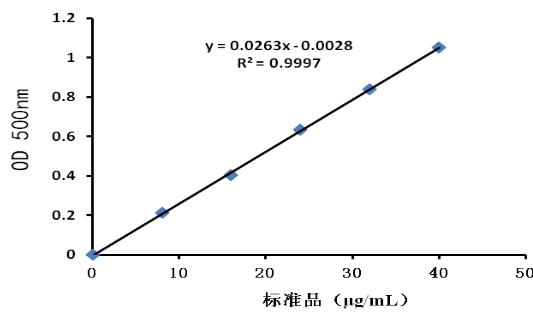
乙酸乙酯	500	500
37°C震荡 10min, 取上层溶液, N2 吹干 (若没有氮吹仪设备, 可 70°C下蒸发干)。		
无水乙醇	250	250
充分震荡混匀, 待检液按照下表操作		

④ 在 EP 管中直接加入以下试剂:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
待检液	200	200
试剂四	600	600
混匀, 25°C静置 3min, 立即于 500nm 处读取吸光值 A (10min 内读值完成)。ΔA=A 测定管-A 对照管 (每个样本做一个自身对照)。		

五、结果计算:

1、标准曲线方程为: $y=0.0263x-0.0028$, x 是标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$), y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克蛋白每小时分解二氢槲皮素产生 $1\mu\text{g}$ 儿茶素所需酶量为一酶活单位(U)。

$$\text{DFR}(\mu\text{g/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0263 \times V_{\text{乙醇}}] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \times D$$

$$= 190.1 \times (\Delta A + 0.0028) \div \text{Cpr} \times D$$

3、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克样本每小时分解二氢槲皮素产生 $1\mu\text{g}$ 儿茶素所需酶量为一酶活单位 (U)。

$$\text{DFR}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0263 \times V_{\text{乙醇}}] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D$$

$$= 190.1 \times (\Delta A + 0.0028) \div W \times D$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V₁---加入样本体积, 0.1mL;

T---反应时间, 30 min=0.5h;

V_{乙醇}---0.25mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

W---样本质量, g;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒;

附: 标准曲线制作过程:

1 标准品母液 (1mg/mL): 临用前加 1mL 无水乙醇溶解 (1mg/mL)。

2 用无水乙醇把标准品稀释成以下浓度: 0, 8, 16, 24, 32, 40. $\mu\text{g/mL}$ 。

3 按照第④步骤测定管的加样表操作, 依据结果即可制作标准曲线。