

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

(G1008W 微板法 48 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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 15mL×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 1.1mL 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 18mL 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:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、乙酸乙酯、无水乙醇、研钵、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 酶标仪预热 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	40	40
试剂一	130	150
试剂二	20	
试剂三	10	10
混匀, 40°C反应 30min		
乙酸乙酯	200	200

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	100	100
------	-----	-----

充分震荡混匀, 待检液按照下表操作

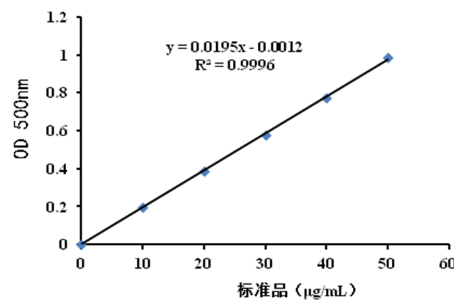
④ 在 96 孔板中直接加入以下试剂:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
待检液	50	50
试剂四	150	150

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: $y=0.0195x-0.0012$, x 是标准品浓度 (μg/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 1μg 儿茶素所需酶量为一酶活单位(U)。

$$DFR(\mu\text{g}/\text{h}/\text{mg prot})=[(\Delta A+0.0012)\div 0.0195\times V_{\text{乙醇}}]\div(V1\times Cpr)\div T\times D$$

$$=256.5\times(\Delta A+0.0012)\div Cpr\times D$$

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 1μg 儿茶素所需酶量为一酶活单位 (U)。

$$DFR(\mu\text{g}/\text{h}/\text{g 鲜重})=[(\Delta A+0.0012)\div 0.0195\times V_{\text{乙醇}}]\div(W\times V1\div V)\div T\times D$$

$$=256.5\times(\Delta A+0.0012)\div W\times D$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.04 mL;

T---反应时间, 30 min=0.5h;

V_{乙醇}---0.1mL;

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, 10, 20, 30, 40, 50. μg/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。