

二氢黄酮醇还原酶（Dihydro flavonol reductase, DFR）试剂盒

分光光度法 50 管/24 样

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

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。

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、1mL 玻璃比色皿、水浴锅、无水乙醇、乙酸乙酯，浓盐酸。

试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 3mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 5mL 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×2 瓶，4℃ 避光保存，临用前每瓶加入 40mL 浓盐酸溶解待用；用不完的试剂 4℃ 避光保存。

测定操作表：

	对照管	测定管
酶液 (μL)	200	200
试剂一 (μL)	700	600
试剂二 (μL)		100
试剂三 (μL)	100	100
试剂四 (μL)		
混匀, 30℃反应 30min		
乙酸乙酯 (μL)	1000	1000
37℃震荡 10min, 取上层溶液, N2 吹干		
无水乙醇 (μL)	500	500
充分震荡		
试剂四(μL)	1500	1500

酶液提取:

1.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。

2.液体: 直接检测。

酶活性计算公式

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) = $(\Delta A - 0.0002) \div 0.0184 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \div 2 = 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div \text{Cpr}$

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 30°C, 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) = $(\Delta A - 0.0002) \div 0.0184 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \div 2 = 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div W$

(3) 按液体体积计算

酶活性定义: 在 30°C, pH7.5 条件下, 每毫升液体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/mL) = $(\Delta A - 0.0002) \div 0.0184 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \div 2 = 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div V_{\text{反总}}$
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