

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

微量法 100管/48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/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、水浴锅、无水乙醇、乙酸乙酯。

试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：液体12mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：液体1.5mL×1瓶，4°C保存。

试剂三：粉剂×1瓶，4°C保存。临用前加2mL蒸馏水溶解；用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融。

试剂四：液体30mL×1瓶，4°C避光保存。

酶液提取

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°C离心10min，取上清，置冰上待测。

测定操作表

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至500nm。
2. 操作表

	对 照 管	测定管
酶液（ $\mu\text{L}$ ）	40	40
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）	140	120
试剂二（ $\mu\text{L}$ ）		20
试剂三（ $\mu\text{L}$ ）	20	20
混匀，30°C反应30min		

乙酸乙酯 (μL)	200	200
37°C震荡10min, 取上层溶液, N2吹干		
无水乙醇 (μL)	100	100
充分震荡		
试剂四(μL)	300	300
混匀, 25°C静置10min, 于微量石英比色皿/96孔板中测定500nm处吸光值A。分别记为A对照管和A测定管, ΔA=A测定管-A对照管		

### 酶活性计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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°C, 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。

$$\text{DFR活性 (mmol/min/mg prot)} = (\Delta A - 0.0002) \div 0.0184 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \div 2$$

$$= 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{DFR活性 (mmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A - 0.0002) \div 0.0184 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \div 2$$

$$= 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div W$$

$V_{\text{反总}}$ : 反应总体积, 1mL;  $V_{\text{样}}$ : 反应体系中样本体积, 0.1mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度, mg/mL;  $W$ , 样本质量, g;  $T$ : 反应时间, 30min

b. 用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线:  $y=0.0092x+0.0002$ ,  $R^2=0.999$

(1) 按照蛋白浓度计算

**酶活性定义:** 在30°C, 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。

$$\text{DFR活性 (mmol/min/mg prot)} = (\Delta A - 0.0002) \div 0.0092 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \div 2$$

$$= 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{DFR活性 (mmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A - 0.0002) \div 0.0092 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \div 2$$

$$= 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div W$$

V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

---

[www.affandi-e.com](http://www.affandi-e.com)