

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

微量法100T/96S

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

花青素还原酶是黄酮合成途径中的关键酶，在植物体内起非常重要的调控作用，对花青素还原酶的调控机制研究有利于从基因水平改变植物的品质。

测定原理

花青素还原酶在NADPH存在的条件下作用于飞燕草色素转变为表没食子儿茶素和NADP，使反应体系在340nm处的吸光值下降，吸光值下降速率反应了花青素还原酶的活性。

需自备的仪器和用品

天平、研钵、低温离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、蒸馏水。

试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：液体20mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：粉剂×1瓶，4°C避光保存。临用前加1mL蒸馏水溶解；用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融。

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

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°C离心10min，取上清，置冰上待测。
2. 培养液等液体：直接检测。

测定操作表

试剂名称	测定管
试剂一（ μL ）	150
试剂二（ μL ）	10
酶液（ μL ）	20
试剂三（ μL ）	10
试剂四（ μL ）	10

充分混匀，于微量石英比色皿/96孔板测定340处吸光值A1，然后在40°C温育20min后，再测定340nm处吸光值A2， $\Delta A=A1-A2$

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

(1) 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：在40°C，pH6.5条件下，每毫克蛋白每分钟催化1nmolNADPH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ANR活性 (nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 80.39 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义：在40°C，pH6.5条件下，每克组织每分钟催化1nmolNADPH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ANR活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 80.39 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

3. 按液体体积计算

酶活性定义：在40°C，pH6.5条件下，每毫升液体每分钟催化1nmolNADPH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ANR活性 (nmol/min/mL)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 80.39 \times \Delta A \end{aligned}$$

V反总：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L / mol / cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.02mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，20min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g

b. 用96孔板测定的计算公式如下

(1) 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：在40°C，pH6.5条件下，每毫克蛋白每分钟催化1nmolNADPH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ANR活性 (nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 160.78 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义：在40°C，pH6.5条件下，每克组织每分钟催化1nmolNADPH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ANR活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 160.78 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按液体体积计算

酶活性定义：在40°C，pH6.5条件下，每毫升液体每分钟催化1nmolNADPH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ANR活性 (nmol/min/mL)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 160.78 \times \Delta A \end{aligned}$$

V反总：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L / mol / cm}$ ；d：比色皿光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.02mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，20min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g