

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

（货号：BP10101F 紫外法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

花青素还原酶（ANR）参与调控花青素的含量水平以及原花青素的形成，是原花青素单体生物合成过程中关键酶之一，在花青素积累过程中具有重要的调节作用。

花青素还原酶（ANR）在 NADPH 存在下使飞燕草色素转变为表没食子儿茶素和 NADP⁺，通过检测反应体系在 340nm 处的吸光值下降速率即可得出花青素还原酶（ANR）活性大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 2 支	-20℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂三	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 加入 1.1mL 乙醇溶解备用，用不完的试剂分装后-20℃避光保存，禁止反复冻融。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，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 的比例进行提取。

② 液体样本：若液体澄清可直接检测；若浑浊则 12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

2、检测步骤：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	60
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	600
340nm, 室温 (25°C) 孵育 5min	
试剂四	20
充分混匀, 立即于 340nm 处读取吸光值 A1, 后于 40°C 温育 20min 后, 再读取吸光值 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】 1. 若 ΔA 的值在零附近徘徊, 可增加样本加样量 V1 (如增至 100 μL, 则试剂三减少至 560 μL), 则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的组织样本, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量 V1 (如减至 40 μL), 则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。
3. 若 ΔA 的值大于 0.2, 则需减少反应时间 (如 40°C 温育 20min 减少至 10min), 则改变后的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算

酶活定义：40°C 条件下, 每毫克组织蛋白每分钟氧化 1nmolNADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ANR 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 96.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算

酶活定义：40°C 条件下, 每克组织每分钟氧化 1nmolNADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ANR 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 96.5 \times \Delta A \div W$$

3、按液体体积计算

酶活定义：40°C 条件下, 每毫升液体每分钟氧化 1nmolNADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ANR 活性 (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T$$

$$= 96.5 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.06mL;

V2---反应体系总体积, 7.2×10^{-4} L;

d---光径, 1cm;

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 20min;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。