

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

(货号: BP10458W 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 3 支	4℃避光保存	每支: 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 0.5mL 乙醇充分溶解, 4℃保存。
试剂三	粉体 1 支	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 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。
试剂四	粉体 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 18mL 盐酸充分溶解, 4℃保存。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

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)、96 孔板、离心管、酶标仪、乙酸乙酯、无水乙醇、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:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃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、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 温度设定 25℃, 调节波长至 500nm。
- ② 试剂放在 40℃水浴 5min;
- ③ 按照下表在 EP 管中依次加入试剂:

试剂组分 (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		

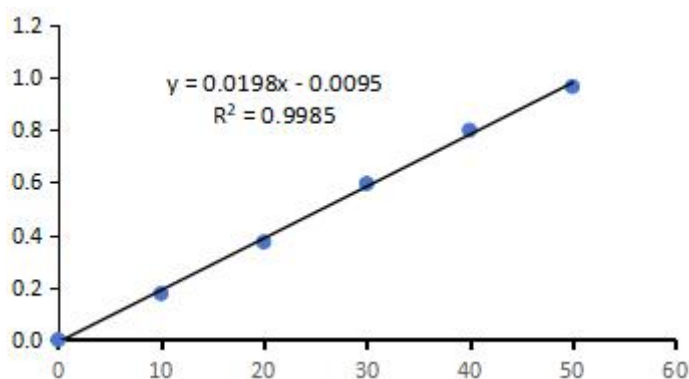
④ 在 96 孔板中直接加入以下试剂:

试剂组分 (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)。		

【注】: 若ΔA 在零附近徘徊, 可延长反应时间 T (如: 50min 或更长), 或加大样本量 V1 (如增至 80μL, 试剂一相应减少), 重新调整后的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程为: $y = 0.0198x - 0.0095$, 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)。

$$DFR(\mu\text{g/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0095) \div 0.0198 \times V_{\text{乙醇}}] \div (V1 \times Cpr) \div T = 252.5 \times (\Delta A + 0.0095) \div Cpr$$

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)。

$$DFR(\mu\text{g/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0095) \div 0.0198 \times V_{\text{乙醇}}] \div (W \times V1 \div V) \div T = 252.5 \times (\Delta A + 0.0095) \div W$$

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;

$V_{\text{乙醇}}$ ---0.1mL; 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 临用前加 1mL 无水乙醇溶解，标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用无水乙醇稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，10，20，30，40，50. $\mu\text{g/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 50uL，加入 950uL 无水乙醇，混匀得到 50ug/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{g/mL}$	0	10	20	30	40	50
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据第④步骤测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水		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)， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		