

二氢黄酮醇还原酶（DFR）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC5785

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	粉剂×1 支	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 支	2-8°C保存
试剂三	粉剂×1 支	2-8°C保存
试剂四	液体 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂五	粉剂×1 瓶	-20°C保存

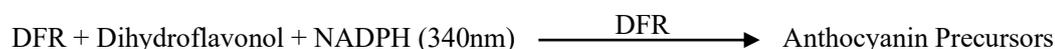
溶液的配制：

- 1、提取液：临用前用蒸馏水稀释 10 倍后使用，稀释后的提取液可 2-8°C保存 8 周。
- 2、混合液：临用前将试剂一，试剂二，试剂三共同溶于 1mL 无水乙醇中充分溶解，溶解后的试剂 2-8°C可以保存 4 周。
- 3、工作液：临用前根据样本量按照混合液：蒸馏水=5μL:495μL（500μL，25T）的比例配制，现用现配。
- 4、试剂五：试剂放于瓶内玻璃管内。临用前加入 6.25mL 蒸馏水中充分溶解，溶解后的试剂-20°C分装保存可以保存 4 周，避免反复冻融。

产品说明：

二氢黄酮醇还原酶，即二氢黄酮醇-4-还原酶（Dihydroflavonol-4-reductase, DFR）是植物花青素生物合成途径的关键酶，可催化二氢黄酮醇生成不同的花青素前体，因此DFR决定着植物中花青素的种类和含量，从而影响植物组织或器官的颜色。

DFR、NADPH和二氢黄酮醇反应生成花青素前体。NADPH在340nm处有最大吸收峰。通过检测NADPH在340nm下的变化速率，即可得到DFR活性的大小。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96UV孔板、研钵/匀浆器、无水乙醇、硫酸铵（AR）、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- (1) 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 0.2g 组织, 加入 2mL 提取液), 进行冰浴匀浆。12000g 4°C离心 15min。取 1mL 上清, 转移至新的 2mL EP 管中。
- (2) 在取出的上清中加入约 0.5g 硫酸铵, 充分溶解后 4°C静置 2h。然后 12000g 4°C离心 15min, 弃掉上清。
- (3) 沉淀中加入 0.4mL 提取液, 充分溶解将此沉淀溶解液作为样本冰上待测。

注: 样本处理提及的提取液均为稀释 10 倍的提取液。

二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计或酶标仪预热30min以上, 调节波长至340nm, 紫外分光光度计蒸馏水调零。
- 2、临用前将试剂四30°C预热100min。
- 3、加样表: (在微量石英比色皿/96UV孔板中加入下列试剂)

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本	40	-
蒸馏水	-	40
工作液	20	20
试剂四	140	140
试剂五	20	20

充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1, 迅速置于30°C水浴或恒温培养箱30min (酶标仪有控温功能可将温度调至30°C), 拿出迅速擦干测定30min10s时的吸光值A2。计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ 。 $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ 。 $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。(空白管只需要做1-2次)

三、DFR活性计算

A、微量石英比色皿

- (1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每mg组织蛋白每分钟消耗1nmolNADPH定义为一个酶活性单位。

$$\text{DFR活性(U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{总}} \times 10^9 \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 29.475 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

- (2) 按样本质量计算:

单位的定义: 每g组织每分钟消耗1nmolNADPH定义为一个酶活性单位。

$$\text{DFR活性(U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{总}} \times 10^9 \div (W \div 2 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 2 = 23.58 \times \Delta A \div W$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm ; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $220\mu\text{L} = 0.22 \times 10^{-3} \text{ L}$; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^9 \text{ nmol}$; C_{pr} : 上清液蛋白浓度, mg/mL ; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $40\mu\text{L} = 0.04\text{mL}$; $V_{\text{提取}}$: 样本总体积, 0.4mL ; 2 : 即前处理(3)的沉淀为前处理(1)匀浆的一半; T : 反应时间, 30min ; W : 样本质量, g 。

B、96孔UV板

将上述公式中的 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.6\text{cm}$ (96孔UV板光径) 进行计算即可。

注意事项:

- 1、如果 $\Delta A_{\text{测定}} > 1$ 或者 $A1_{\text{测定}} < A1_{\text{空白}}$, 可以用提取液 (稀释) 将样本 (前处理中的沉淀溶解液) 进行稀释或者缩短 30°C 反应时间; $\Delta A_{\text{测定}} < 0.01$, 可以加大样本量或者延长 30°C 反应时间。最终计算时同步修改计算公式。

实验实例:

1、称取 0.2152g 向日葵，加入提取液进行冰浴匀浆，按照测定步骤操作，用 96 孔 UV 板测得计算 ΔA 测定 =0.916-0.833 =0.083， ΔA 空白=0.723-0.700=0.023。 $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白=0.06，带入公式计算：
DFR活性(U/g 质量)=23.58÷0.6（96孔UV板光径）× ΔA ÷W =10.957 U/g 质量

参考文献：

[1] Hayashi M, Takahashi H, Tamura K, et al. Enhanced dihydroflavonol-4-reductase activity and NAD homeostasis leading to cell death tolerance in transgenic rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(19):p.7020-7025.

[2] Petit P, Granier T, Béatrice Langlois d'Estaintot, et al. Crystal Structure of Grape Dihydroflavonol 4-Reductase, a Key Enzyme in Flavonoid Biosynthesis[J]. Journal of Molecular Biology, 2007, 368(5):1345-1357.

相关系列产品：

BC1350/BC1355 植物原花青素（OPC）含量检测试剂盒

BC4090/BC4095 花青素还原酶（ANR）活性检测试剂盒

