



## 二氢黄酮醇还原酶检测试剂盒

### DFR Assay Kit

分光光度法

产品编号: AK365V

产品规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES365	50mL×1瓶	4℃保存;
AK365-A	30mL×1瓶	4℃保存;
AK365-B	3mL×1瓶	4℃保存;
AK365-C	粉剂×1瓶	4℃保存。临用前加 5mL 蒸馏水溶解; 剩余试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
AK365-D	液体 40mL×2瓶	4℃避光保存;
AK365-标准品	粉剂×1支	临用前加入 1 mL 无水乙醇溶解, 配成 10 mg/mL 溶液备用; 4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

#### 简介:

**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。

**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。

#### 自备用品:

可见分光光度计、恒温水浴锅、天平、研钵、1mL 玻璃比色皿、乙醇和蒸馏水。

#### 酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g): ES365 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES365), 进行冰浴匀浆。10000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 液体: 直接检测。

#### 测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长至 500nm。
2. 将 10 mg/mL 标准液用无水乙醇稀释为 0.25、0.2、0.15、0.1、0.05、0.25、0.01mg/mL 的标准溶液备用。
3. 操作表 (在 1mL 玻璃比色皿中加入如下试剂):

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
酶液	200	200		
AK365-A	700	600		
AK365-B		100		
AK365-C	100	100		
混匀, 30℃反应 30min				
乙酸乙酯	1000	1000		
37℃震荡 10min, 取上层溶液, N2 吹干				
标准溶液			500	
无水乙醇	500	500		500

充分震荡				
AK365-D	1500	1500	1500	1500
混匀，25℃静置 10min，于 1mL 玻璃比色皿测定 500nm 处吸光值 A。分别记为 A 对照管、A 测定管、A 空白管和 A 标准管。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。（空白需检测 1-2 次）。				

## 酶活性计算公式

### 1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x，mg/mL）和吸光度  $\Delta A$  标准（y， $\Delta A$  标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将  $\Delta A$  测定（y， $\Delta A$  测定）带入公式计算样本浓度（x，mg/mL）。

### 2. 酶活性的计算

#### （1）按蛋白浓度计算

酶活定义：在 30℃，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。

$$\text{DFR 活性}(\text{mmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \div 2 = 0.083x \div \text{Cpr}$$

#### （2）按样本质量计算

酶活定义：在 30℃，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。

$$\text{DFR 活性}(\text{mmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \div 2 = 0.083x \div W$$

注：V 反总：反应总体积，1mL；V 样：反应体系中样本体积，0.2mL；V 样总：加入 ES365 体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W，样本质量，g；T：反应时间，30min。

### 1. 按照蛋白浓度计算

**酶活性定义：**在 30℃，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。

$$\text{DFR 活性}(\text{mmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0002) \div 0.0184 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \div 2 = 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div \text{Cpr}$$

### 2. 按照样本质量计算

**酶活性定义：**在 30℃，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。

$$\text{DFR 活性}(\text{mmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0002) \div 0.0184 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \div 2 = 9.06 \times (\Delta A - 0.0002) \div W$$

### 3. 按液体体积计算

**酶活性定义：**在 30℃，pH7.5 条件下，每毫升液体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。

$$\text{DFR 活性}(\text{mmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0002) \div 0.0184 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \div 2 = 9.06 \times (\Delta A - 0.0002)$$

注：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 ES365 体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W，样本质量，g；T：反应时间，30min。