

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

(分光法 24 样)

### 一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉体×1 支	4℃ 保存	临用前离心或甩几下使试剂落入底部，再加 1.5mL 乙醇充分溶解，4℃ 保存。
试剂三	粉体×1 支	-20℃ 保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，分别加 1.5mL 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	临用前离心或甩几下使试剂落入底部，再加 36mL 盐酸充分溶解，4℃ 保存。
标准品	粉体×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

### 三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、台式离心机、可调式移液器、研钵、乙酸乙酯、无水乙醇、冰。

### 四、二氢黄酮醇还原酶（DFR）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

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、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 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：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	325	375
试剂二	50	
试剂三	25	25
混匀，40℃ 反应 30min		

乙酸乙酯	500	500
37°C震荡 10min, 取上层溶液, N2 吹干		
无水乙醇	250	250
充分震荡混匀, 待检液按照下表操作		

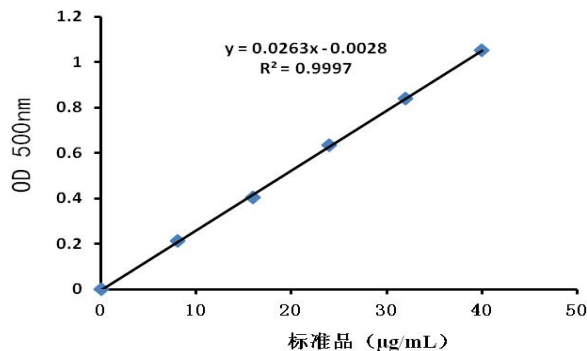
④ 在 EP 管中直接加入以下试剂:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
待检液	200	200
试剂四	600	600
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 150μL, 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:  $y=0.0263x-0.0028$ , 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)。

$$\begin{aligned} \text{DFR} (\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0263 \times V_{\text{乙醇}}] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 190.1 \times (\Delta A + 0.0028) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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)。

$$\begin{aligned} \text{DFR} (\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0263 \times V_{\text{乙醇}}] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 190.1 \times (\Delta A + 0.0028) \div W \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.1mL;

T---反应时间, 30 min=0.5h;

$V_{\text{乙醇}}$ ---0.25mL; 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 标准品母液 (1mg/mL): 临用前加 1mL 无水乙醇溶解 (1mg/mL)。
- 2 用无水乙醇把标准品稀释成以下浓度: 0, 8, 16, 24, 32, 40. μg/mL。也可根据实际来调整标准品浓度。
- 3 按照第④步骤测定管的加样表操作, 依据结果即可制作标准曲线。