上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

二氢黄酮醇还原酶检测试剂盒（分光光度法）

货号： R42007

规格： 50T/24S

有效期：6个月

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES365	50mL×1瓶	2-8℃保存；
试剂-A	30mL×1瓶	2-8℃保存；
试剂-B	3mL×1瓶	2-8℃保存；
试剂-C	粉剂×1瓶	2-8℃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。
试剂-D	液体 40mL×2 瓶	2-8℃避光保存；
标准品	粉剂×1支	临用前加入1mL无水乙醇溶解，配成10mg/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		
试剂-A	700	600		
试剂-B		100		
试剂-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				
试剂-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△A=A测定管-A对照管，△A标准=A标准管-A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ΔA 标准（y，ΔA 标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将ΔA测定（y，ΔA 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。

DFR 活性(mmol/min/mg prot) = x×V 反总÷(V 样×Cpr)÷T÷2 =0.083x÷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。

DFR 活性(mmol/min/g 鲜重) = x×V 反总÷(V 样×W÷V 样总)÷T÷2 = 0.083x÷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。

DFR 活性(mmol/min/mg prot) = (△A-0.0002)÷0.0184×V 反总÷(V 样×Cpr)÷T÷2 = 9.06×(△A-0.0002)÷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。

DFR 活性(mmol/min/g 鲜重) = (△A-0.0002)÷0.0184×V 反总÷(V 样×W÷V 样总)÷T÷2 = 9.06×(△A-0.0002)÷W3. 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。

DFR 活性(mmol/min/mL) = (△A-0.0002)÷0.0184×V 反总÷V 样÷T÷2 = 9.06×(△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。