



二氢黄酮醇还原酶（DFR）活性检测试剂盒

Dihydroflavonol-4-Reductase (DFR) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



二氢黄酮醇还原酶（DFR）活性检测试剂盒

Dihydroflavonol-4-Reductase (DFR) Activity Assay Kit

一、产品描述

二氢黄酮醇还原酶又称二氢黄酮醇-4-还原酶，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，进而影响花色的形成和变化，并通过合成类黄酮等抗氧化剂，参与植物的抗氧化防御机制，保护细胞免受氧化损伤，其催化原理和调控机制分析有助于深入了解植物生理和保护机制，并在农业、药物和抗氧化剂等领域具有广泛的应用价值。

二氢黄酮醇还原酶能够催化二氢黄酮醇和 NADPH 反应生成花青素前体，NADPH 在 340 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值的变化速率即可表征二氢黄酮醇还原酶的活性。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液		液体 30 mL×1 瓶	4°C保存	使用前按提取液:蒸馏水=1:9 体积比配制 (现用现配，充分混匀即为提取液应用液)
试剂一	组分 A	粉剂×1 支	4°C保存	使用前将组分 A、组分 B 和组分 C 共同 溶于 1 mL 无水乙醇中充分溶解 (配制后 4°C可保存一个月，注意密封保存)
	组分 B	粉剂×1 支	4°C保存	
	组分 C	粉剂×1 支	4°C保存	
试剂二		液体 15 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂三		粉剂×1 瓶	-20°C保存	使用前加入 6.25 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月，避免反复冻融)
检测工作液的制备（现用现配）：根据使用量按试剂一:蒸馏水=1:99 体积比配制并充分混匀，即为检测工作液。				

需自备试剂：无水乙醇（C₂H₆O，MW=46.07，CAS:64-17-5）

硫酸铵（(NH₄)₂SO₄，MW=132.14，CAS:7783-20-2）

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿（光径 10 mm）/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①按照组织质量（g）：提取液应用液体积（mL）为 1:（5-10）的比例（建议称取 0.2 g 组织，加入 2 mL 提取液应用液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 10 min，弃沉淀，取上清液；

②吸取步骤①离心上清液 1 mL 至 2 mL 离心管中，加入 500 mg 硫酸铵充分溶解，4℃静置 2 h；4℃ 12000 g 离心 10 min，弃上清，留沉淀；

③在步骤②离心沉淀中加入 400 μL 提取液应用液，充分振荡至沉淀完全溶解即为粗酶液，置于冰上待测。

2.测定步骤

①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。

②试验前将试剂二 30℃预热 15 min 以上。

③在 96 孔板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
粗酶液	40	-
蒸馏水	-	40
检测工作液	20	20
试剂二	140	140
试剂三	20	20

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②30℃准确反应 30 min，测定 30 min 10 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.二氢黄酮醇还原酶（DFR）活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DFR (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}} \times T} = \frac{58.95 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DFR (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times V_{\text{提取}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times W \times T \times V_{\text{上清}}} = \frac{47.16 \times \Delta A}{W}$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DFR (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{29.47 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DFR (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times V_{\text{提取}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times W \times T \times V_{\text{上清}}} = \frac{23.58 \times \Delta A}{W}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.04 mL；V 样总：粗酶液总体积，0.4 mL；V 反总：反应体系总体积， 2.2×10^{-4} L；V 提取：提取过程中第一次加入提取应用液的体积，2 mL；V 上清：提取过程中吸取上清液的体积，1 mL； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d_1 ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； d_2 ：微量石英比色皿光径，1.0 cm；T：反应时间，30 min；W：样本质量，g； 10^9 ：单位换算系数，1 mol/L = 10^9 nmol/L。

四、注意事项

①准确在规定时间点完成吸光值测定，以确保检测结果的准确性和重复性；

②若 ΔA 测定大于 1.0 或 A1 测定小于 A1 空白，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定；若 ΔA 测定小于 0.02，建议适当延长酶促反应时间或增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；

③为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

