

花青素还原酶（ANR）检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

花青素还原酶是黄酮合成途径中的关键酶，在植物体内起非常重要的调控作用，对花青素还原酶的调控机制研究有利于从基因水平改变植物的品质。

测定原理：

花青素还原酶在 NADPH 存在的条件下作用于飞燕草色素转变为表没食子儿茶素和 NADP，使反应体系在 340nm 处的吸光值下降，吸光值下降速率反应了花青素还原酶的活性。

试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 40mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加 3mL 蒸馏水溶解；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加 3mL 蒸馏水溶解；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加 3mL 蒸馏水溶解；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

酶液提取：

- 1. 组织：**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 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。10000g，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 2. 培养液等液体：**直接检测。

测定操作表:

试剂名称	测定管
试剂一 (μL)	750
试剂二 (μL)	50
酶液 (μL)	100
试剂三 (μL)	50
试剂四 (μL)	50

充分混匀, 于 1mL 石英比色皿测定 340 处吸光值 A1, 然后在 40℃温育 20min 后, 再测定 340nm 处吸光值 A2, $\Delta A = A1 - A2$

酶活性计算公式:

(1) 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 在 40℃, pH6.5 条件下, 每毫克蛋白每分钟催化 1nmolNADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ANR 活性 (nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 80.39 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 40℃, pH6.5 条件下, 每克组织每分钟催化 1nmolNADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ANR 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 80.39 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按液体体积计算

酶活性定义: 在 40℃, pH6.5 条件下, 每毫升液体每分钟催化 1nmolNADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ANR 活性 (nmol/min/mL)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 80.39 \times \Delta A \end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 1mL;

ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L / mol / cm}$;

d: 比色皿光径, 1cm;

V 样: 加入样本体积, 0.1mL;

V 样总: 加入提取液体积, 1mL;

T: 反应时间, 20min;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

W: 样本质量, g