

花青素还原酶 (Anthocyanidin reductase, ANR) 试剂盒说明书 (货号: G1006F24 分光法 24 样)

一、产品简介:

花青素还原酶 (ANR) 参与调控花青素的含量水平以及原花青素的形成, 是原花青素单体生物合成过程中关键酶之一, 在花青素积累过程中具有重要的调节作用。

花青素还原酶 (ANR) 在 NADPH 存在下使飞燕草色素转变为表没食子儿茶素和 NADP⁺, 通过检测反应体系在 340nm 处的吸光值下降速率即可得出花青素还原酶 (ANR) 活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

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	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 每支分别加 0.3mL 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。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂 μg×1 支	-20℃避光保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 0.6mL 乙醇溶解备用, 用不完的试剂分装后-20℃避光保存, 禁止反复冻融。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、无水乙醇、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰。

四、花青素还原酶 (ANR) 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:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织样本, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃离心 10min, 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 的比例进行提取。

② 液体样本: 若液体澄清可直接检测; 若浑浊则 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	60
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	600
340nm, 室温 (25℃) 孵育 5min	

试剂四	20
充分混匀,立即于 340nm 处读取吸光值 A1,后于 40℃温育 20min 后,再读取吸光值 A2, $\Delta A=A1-A2$ 。	

【注】1 若 ΔA 的值在零附近徘徊,可增加样本加样量 V1 (如增至 100 μ L, 则试剂三减少至 560 μ L), 则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。

2. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的组织样本, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量 V1 (如减至 40 μ L), 则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。

3. 若 ΔA 的值大于 0.2, 则需减少反应时间 (如 40℃温育 20min 减少至 10min), 则改变后的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算

酶活定义: 40℃条件下, 每毫克组织蛋白每分钟氧化 1nmolNADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ANR 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ = 96.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算

酶活定义: 40℃条件下, 每克组织每分钟氧化 1nmolNADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ANR 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 96.5 \times \Delta A \div W$$

3、按液体体积计算

酶活定义: 40℃条件下, 每毫升液体每分钟氧化 1nmolNADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ANR 活性 (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T \\ = 96.5 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.06mL;

V2---反应体系总体积, 7.2 $\times 10^{-4}$ L;

d---光径, 1cm;

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 20min;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。