花青素还原酶（anthocyanidin reductase，ANR）试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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。

需自备的仪器和用品

天平、研钵、低温离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、蒸馏水。

试剂组成和配制

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃避光保存。临用前加 1mL 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 1mL 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 1mL 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）	150
试剂二（μL）	10
酶液（μL）	20
试剂三（μL）	10
试剂四（μL）	10

充分混匀，于微量石英比色皿/96 孔板测定 340 处吸光值 A1，然后在 40℃温育 20min 后，再测定 340nm 处吸光值 A2，△A=A1-A2

酶活性计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

（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。

ANR 活性（nmol/min/mg prot）= ΔA÷（ε×d）×V 反总÷(V 样×Cpr) ÷T

= 80.39×ΔA÷Cpr

（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。

ANR 活性（nmol/min/g 鲜重）= ΔA÷（ε×d）×V 反总÷(W ×V 样÷V 样总) ÷T

= 80.39×ΔA÷W

（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。

ANR 活性（nmol/min/mL）= ΔA÷（ε×d）×V 反总÷V 样÷T

= 80.39×ΔA

V 反总：反应体系总体积，0.2mL；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02mL；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

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

（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。

ANR 活性（nmol/min/mg prot）= ΔA÷（ε×d）×V 反总÷(V 样×Cpr) ÷T

= 160.78×ΔA÷Cpr

（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。

ANR 活性（nmol/min/g 鲜重）= ΔA÷（ε×d）×V 反总÷(W ×V 样÷V 样总) ÷T

= 160.78×ΔA÷W

（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。

ANR 活性（nmol/min/mL）= ΔA÷（ε×d）×V 反总÷V 样÷T

= 160.78×ΔA

V 反总：反应体系总体积，0.2mL；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.02mL；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