

使用说明书

Instruction Manual

花青素还原酶检测试剂盒（微量法）

ANR Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0026M-ES	100mL× 1 瓶	4℃保存。
CB0026M-A	20mL×1 瓶	4℃保存。
CB0026M-B	粉剂×1 瓶	4℃避光保存。临用前加 1mL 蒸馏水溶解；剩余试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
CB0026M-C	粉剂×1 瓶	4℃避光保存。临用前加 1mL 蒸馏水溶解；剩余试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
CB0026M-D	粉剂×1 瓶	4℃避光保存。临用前加 1mL 蒸馏水溶解；剩余试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品：

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

二、酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液 CB0026M-ES 体积(mL)为 1：5-10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0026M-ES），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。

三、测定步骤：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 340nm。
2. 操作表：

试剂名称	测定管 (μL)
CB0026M-A	150
CB0026M-B	10
酶液	20
CB0026M-C	10
CB0026M-D	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°C 温育 20min 后，再测定 340nm 处吸光值 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。

四、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°C，pH6.5 条件下，每毫克蛋白每分钟催化 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ANR 活性(nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 80.39 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

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

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

3. 按液体体积计算

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

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

注：V 反总：反应体系总体积，0.2mL； 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，0.02mL；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

标准曲线： $y = 0.0092x + 0.0002$ ， $R^2 = 0.999$

1. 按照蛋白浓度计算

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

$$\text{ANR 活性(nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 160.78 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

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

$$\text{ANR 活性(nmol/min/g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 160.78 \times \Delta A \div W$$

3. 按液体体积计算

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

$$\text{ANR 活性(nmol/min/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 160.78 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；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。

注意事项

1. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

