



花青素还原酶(ANR)活性检测试剂盒

中文名称：[花青素还原酶\(ANR\)活性检测试剂盒](#)

英文名称：MAnthocyanidin Reductase Activity Assay Kit

储存条件：-20°C

推 荐：若使用 96 孔板测定，需使用 96 孔 UV 板

产品包装：盒装

检测方法：微量法

产品规格：100T/48S

有效期：6 个月

自备试剂：该试剂盒实验过程中需自备试剂，详情见网站说明书

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 25mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×2 支	2-8°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 1 mL×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

- 1、提取液：内含不溶物，使用前摇匀。
- 2、试剂二：临用前加入 1mL 蒸馏水备用，-20°C可分装保存 4 周，避免反复冻融。
- 3、试剂三：粉剂置于试剂瓶内玻璃管中。临用前加入 1 mL 乙醇和 1mL 蒸馏水混匀溶解



备用。可以分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融。

产品说明:

花青素还原酶 (ANR) 是原花青素生物合成途径中的关键酶，使花色素转变为相应的顺式黄烷-3-醇，在植物体内起着非常重要的调控作用。

NADPH 在 ANR 作用下将花色素转化为黄烷-3-醇和 NADP，在 340nm 下测定 NADPH 的减少速率，即可反映 ANR 活性。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验，如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、乙醇、冰和蒸馏水。

操作步骤

一、样本处理(可适当调整待测样本量)

1、组织：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。12000g 4℃离心 15 分钟，取上清，置冰上待测。

2、细胞或细菌样本的制备：先收集细胞或细菌样本到离心管内，弃上清，按照每 500 万细胞或细菌加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）。12000g，4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1、紫外分光光度计/酶标仪预热 30min，波长调至 340nm，蒸馏水调零。

2、加样表：

试剂名称(μL)	测定管	对照管
----------	-----	-----



试剂一	170	170
试剂二	10	10
试剂三	5	5
样本	10	-
上述试剂混匀后 37°C水浴反应 30min。		
试剂四	5	5
样本	-	10

混匀后测量测定管和对照管在 340nm 下的吸光度, 分别记为 A 测定管、A 对照管, 计算 Δ

$A = A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}$ 。

三、ANR 酶活计算

A、按微量石英比色皿计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟减少 1nmol NADPH 的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{ANR 酶活(U/mgprot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 107.18 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本质量计算:

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟减少 1nmol NADPH 的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{ANR 酶活(U/g 质量)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 107.18 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞或细菌个数计算:

单位的定义: 每 10^4 个细胞或细菌在反应体系中每分钟减少 1nmol NADPH 的酶量定义为一个酶活性单位。ANR 酶活(U/ 10^4 cell) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.2144 \times \Delta A$

V 反总: 反应总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADPH 的摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d:



比色皿光径, 1cm; V 样: 加入的样本体积, 0.01mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; V 提取: 提取液体积, 1mL; 500: 500 万个细胞; T: 反应时间, 30min; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

B、按 96 孔 UV 板计算:

将上述公式中的 d- 1cm 改为 d-0.6cm (96 孔 UV 板光径) 进行计算即可。

注意事项:

1. 当 ΔA 大于 0.4 或者 A 对照管大于 1(96 孔 UV 板为 ΔA 大于 0.2 或者 A 对照管大于 1) 时, 建议将反应混合液用试剂 一稀释更大倍数或者减少加入的样本体积进行测定; ΔA 过小时, 可以增加酶促反应时间(45min 或 60min)或增加加入的样本体积来测定。
2. 加入试剂四后, 请在 15min 内测定完成。
3. 样本蛋白浓度另行测定。

实验实例:

1. 取 0.1g 苹果加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 使用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A=A$ 对照管-A 测定管=0.9333-0.8095=0.1238,使用微量石英比色皿按样本质量计算酶活得:

ANR 酶活(U/g 质量)= $107.18 \times \Delta A \div W = 107.18 \times 0.1238 \div 0.1 = 132.69$ U/g 质量。