

花青素还原酶（anthocyanidin reductase, ANR）试剂盒说明书 (微板法 48 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 60mL×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 15mL×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：

酶标仪、96孔板、台式离心机、无水乙醇、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	150
340nm，室温（25℃）孵育 5min	
试剂四	10

充分混匀,立即于 340nm 处读取吸光值 A1,后于 40°C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 40 μ L, 则试剂三减少至 130 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 10 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°C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°C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。

$$\begin{aligned} \text{ANR 活性 (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 160.8 \times \Delta A \div Cpr \end{aligned}$$

2、按样本鲜重计算

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

$$\begin{aligned} \text{ANR 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 160.8 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

3、按液体体积计算

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

$$\begin{aligned} \text{ANR 活性 (nmol/min/mL)} &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T \\ &= 160.8 \times \Delta A \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

V2---反应体系总体积, 2×10^{-4} L;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 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。