

## 花青素还原酶（ANR）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号：BC4090

规格：50T/24S

**产品组成：**使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

| 试剂名称 | 规格           | 保存条件   |
|------|--------------|--------|
| 提取液  | 液体 30 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂一  | 液体 50 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂二  | 粉剂×1 瓶       | 2-8℃保存 |
| 试剂三  | 粉剂×1 瓶       | -20℃保存 |
| 试剂四  | 液体 2 mL×1 瓶  | 2-8℃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 3 mL 蒸馏水备用。 -20℃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 1 mL 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。

**需自备的仪器和用品：**

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL石英比色皿、研钵/匀浆器、乙醇(>98%，AR)、冰和蒸馏水。

**操作步骤：****一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

- 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 200W，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                   | 850 | 850 |
| 试剂二                   | 50  | 50  |
| 试剂三                   | 25  | 25  |
| 样本                    | 50  | -   |
| 上述试剂混匀后37°C水浴反应30min。 |     |     |
| 试剂四                   | 25  | 25  |
| 样本                    | -   | 50  |

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

## 三、ANR酶活计算

### 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。

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

### 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<sup>4</sup>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。

$$\text{ANR酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.2144 \times \Delta A$$

V反总：反应总体积，0.001L； $\epsilon$ ：NADPH的摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；d：1mL石英比色皿，1cm；V样：加入的样本体积，0.05mL；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<sup>9</sup>：单位换算系数，1mol=10<sup>9</sup>nmol。

## 注意事项：

- 当 $\Delta A$ 大于0.4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； $\Delta A$ 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。
- 加入试剂四后，请在15min内测定完成。
- 样本蛋白浓度另行测定。

## 实验实例：

- 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，测得计算  $\Delta A = A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}} = 0.922 - 0.813 = 0.109$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{ANR酶活 (U/g 质量)} = 107.18 \times \Delta A \div W = 107.18 \times 0.109 \div 0.1 = 116.83 \text{ U/g 质量。}$$

## 相关发表文献：

- [1] Chen Y, Li D, Zhang X, Ma Q, Xu Y, Luo Z. Azacytidine-induced hypomethylation delays senescence and coloration in harvested strawberries by stimulating antioxidant enzymes and modulating abscisate metabolism to minimize anthocyanin overproduction. Food Chem. 2023 May 1;407:135189. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.135189. Epub 2022



Dec 10. PMID: 36525805.

**相关系列产品:**

BC1360/BC1365 尿酸 (UA) 含量检测试剂盒

BC1340/BC1345 植物总酚 (TP) 含量检测试剂盒

BC1330/BC1335 植物类黄酮含量检测试剂盒

