

## CheKine™ 花青素还原酶 (ANR) 活性检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB3010

规格: 48 T/24 S    96 T/48 S

批号: 见产品标签

|                                                                                   |                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
|  | 适用样本: 植物组织         |
|  | 保质期: -20℃, 保存 6 个月 |

### 01 背景与原理

花青素还原酶 (Anthocyanidin reductase, ANR, EC 1.3.1.77) 是原花青素生物合成途径中的关键酶之一, 可使花色素转变为相应的顺式黄烷-3-醇, 对植物体内类黄酮类物质的合成、花色苷的积累, 具有重要作用。

本试剂盒检测原理是 ANR 可催化 NADPH 和花色素转化为黄烷-3-醇和 NADP<sup>+</sup>, NADPH 在 340 nm 有吸收峰, 而 NADP<sup>+</sup>没有; 通过测定 340 nm 光吸收下降速率, 计算 ANR 活性。

### 02 包装清单

| 试剂盒组分             | 规格            |               | 储存要求 |
|-------------------|---------------|---------------|------|
|                   | 48 T          | 96 T          |      |
| Extraction Buffer | 60 mL         | 60×2 mL       | 4℃   |
| Reagent I         | 12 mL         | 24 mL         | 4℃   |
| Reagent II        | Powder×1 vial | Powder×1 vial | -20℃ |
| Reagent III       | Powder×1 vial | Powder×1 vial | -20℃ |
| Reagent IV        | Powder×1 vial | Powder×1 vial | 4℃   |

\*请在实验前检查各组分的量。

\*各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

| 自备资源类型 | 资源名称                     | 备注                        |
|--------|--------------------------|---------------------------|
| 仪器     | 酶标仪                      | 能测 340 nm 处的吸光度           |
| 耗材     | 96 孔酶标板                  | UV 板                      |
| 试剂     | 去离子水、无水乙醇                | 配制试剂用                     |
| 其他     | 匀浆器、低温离心机、恒温箱、可调节式移液枪及枪头 | 检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率 |

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

| 试剂名称                | 试剂准备                                                 | 注意事项                      |
|---------------------|------------------------------------------------------|---------------------------|
| Extraction Buffer   | 即用型；内含不溶物，使用前摇匀                                      | 4℃ 保存                     |
| Reagent I           | 即用型                                                  | 4℃ 保存                     |
| Working Reagent II  | 临用前配制；48 T 加入 0.7 mL 去离子水，96 T 加入 1.4 mL 去离子水，充分溶解待用 | 未用完的试剂-20℃分装保存 1 周，避免反复冻融 |
| Working Reagent III | 临用前配制；48 T 加入 0.5 mL 50%乙醇，96 T 加入 1 mL 50%乙醇，充分溶解待用 | 未用完的试剂-20℃分装保存 1 周，避免反复冻融 |
| Working Reagent IV  | 临用前配制；48 T 加入 0.5 mL 去离子水，96 T 加入 1 mL 去离子水，充分溶解待用   | 未用完的试剂-4℃保存 1 周           |

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。

- 植物组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer（注意混匀），进行冰浴匀浆，10000 g，4℃ 离心 10 min，取上清，置冰上待测。

### 05-3 实验步骤

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 340 nm。
2. 检测体系配制：在 96 孔 UV 板中按照如下方式操作，每个测定孔需设置一个对照孔：

| 试剂                  | 测定孔 (μL) | 对照孔 (μL) |
|---------------------|----------|----------|
| Reagent I           | 170      | 170      |
| Working Reagent II  | 10       | 10       |
| Working Reagent III | 5        | 5        |
| 样本                  | 10       | 0        |
| 充分混匀后，37℃反应 30 min  |          |          |
| Working Reagent IV  | 5        | 5        |
| 样本                  | 0        | 10       |

3. 吸光度检测：混匀后，记录 340 nm 处的吸光值，分别记为  $A_{\text{测定}}$  和  $A_{\text{对照}}$ 。

## 06 结果计算

### 06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)>进入“技术中心”>查找“在线计算器”工具。



### 06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

#### 1. 数据处理

计算  $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$

#### 2. 样本 ANR 活力的计算：

- 按样本质量计算：

酶活单位定义：每 g 组织每分钟减少 1 nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{ANR(U/g)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 214.36 \times \Delta A \div W$$

- 按蛋白浓度计算

酶活单位定义：每 mg 蛋白每分钟减少 1 nmol NADPH 为 1 个酶活单位。

$$\text{ANR(U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 214.36 \times \Delta A \div Cpr$$

$\epsilon$ : NADPH 摩尔吸光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ : 96 孔 UV 板光径, 0.5 cm;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;  $10^9$ :  $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.01 mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入 Extraction Buffer 体积, 1 mL;  $Cpr$ : 样本蛋白浓度, mg/mL;  $W$ : 样品质量, g;  $T$ : 反应时间, 30 min。

## 07 结果展示

示例-1: 取 0.1 g 玉米种子，按照测定步骤操作，用 96 孔 UV 板进行检测。测得  $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}} = 0.722 - 0.609 = 0.113$ 。按样本质量计算得： $\text{ANR(U/g)} = 214.36 \times \Delta A \div W = 242.2 \text{ U/g}$ 。

## 08 FAQ

- 检测得到的样本  $\Delta A$  过高或者过低怎么办？

如果样本  $\Delta A > 0.4$ ，样本需用 Extraction Buffer 适当稀释，再重新测定，或减少提取用样本量。如果样本的  $\Delta A < 0.01$ ，可适当提高样本量。

## 09 相关产品

| 货号             | 试剂盒名称                             |
|----------------|-----------------------------------|
| <b>KTB1541</b> | CheKine™ 单宁含量检测试剂盒（微量法）           |
| <b>KTB1542</b> | CheKine™ 单宁酶（Tannase）活性检测试剂盒（微量法） |

# CheKine™ 花青素还原酶（ANR）活性检测流程示意图

(Abbkine 货号：KTB3010)

样本处理



植物组织

1 mL Extraction Buffer  
冰浴匀浆



10000 g，4℃离心10 min，取上清



体系配置



测定孔

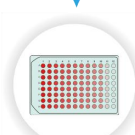
Reagent I 170  $\mu$ L  
Working Reagent II 10  $\mu$ L  
Working Reagent III 5  $\mu$ L  
样本 10  $\mu$ L  
充分混匀后，37℃反应30 min  
Working Reagent IV 5  $\mu$ L



对照孔

Reagent I 170  $\mu$ L  
Working Reagent II 10  $\mu$ L  
Working Reagent III 5  $\mu$ L  
充分混匀后，37℃反应30 min  
Working Reagent IV 5  $\mu$ L  
样本 10  $\mu$ L

数据检测



混匀后，测定340 nm处的吸光度  
结果计算