

类黄酮糖基转移酶 (UFGT) 试剂盒说明书

紫外分光光度法: **50 管/48 样**

注 意: 正式测定之前选择 **2-3** 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义:

类黄酮是植物次生代谢产物, 糖基化是类黄酮基本结构形成的最主要的修饰反应之一, 提高了类黄酮苷元的化学稳定性, 这一过程主要由类黄酮糖基转移酶催化的, 使类黄酮-OH 与 UDPG 反应, 是黄酮合成途径中的关键酶。

测定原理:

类黄酮糖基转移酶催化花青素与尿苷二磷酸葡萄糖反应产生花青苷, 主要以矢车菊素 3-葡萄糖苷 (C3G) 形式存在, 用 HPLC 检测产物可反映类黄酮糖基转移酶的酶活性。

自备实验用品及仪器:

天平、研钵、离心机、恒温水浴锅、100 目筛、高校液相色谱、针头过滤器 (水系、0.22 μm)、滤膜 (水系、0.45 μm)、耐水 C18 柱 (4.6 \times 250mm)、样品瓶、甲酸、甲醇 (色谱级)、超纯水

试剂组成和配制:

提取液: 液体 50mL \times 1 瓶, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

试剂一: 粉剂 \times 1 瓶, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。临用前加全部试剂三溶解。

试剂二: 液体 5mL \times 1 瓶, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

试剂三: 液体 8mL \times 1 瓶, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

标准品: 标准品 \times 1 支, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

样本处理:

组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 2~5 的比例 (建议称取约 0.5g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。10000g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

实验前的准备工作:

1、检测产物制备

	对照管	测定管
样本 (μL)	100	100
试剂二 (μL)	100	
试剂一 (μL)		150
充分混匀, 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30min		
试剂一 (μL)	150	
试剂二 (μL)		100
充分混匀, 10000g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 10min, 取上清过 0.45 μm 水系滤头, 待检测。		

2、将 500 mL 超纯水和 500 mL 甲醇用 0.45 μm 的滤膜抽滤, 以除去溶剂中的杂质, 防止堵塞色谱柱。(注:

蒸馏水用水系滤膜抽滤，甲醇用有机系滤膜抽滤)。

3、流动相的配制：流动相 A 为 1.6%甲酸水溶液；流动相 B 为 1.6%甲酸甲醇溶液。

4、将配好的流动相超声 30 分钟，以脱去溶剂中的气泡，防止堵塞色谱柱。

5、标准品的配制：

在标准品中加入 1mL 甲醇，配成 5 μ mol/mL 母液，将母液用甲醇分别稀释成 2 μ mol/mL，1 μ mol/mL、0.5 μ mol/mL、0.25 μ mol/mL、0.125 μ mol/mL 的标准品溶液。针头式过滤器过滤后待测。

测定操作步骤

1. 开启电脑、检测器和泵，安装上色谱柱，打开软件，在方法组中设置进样量 10 μ L，梯度洗脱为 0~5min，85%A+15%B；5~10min，85%A+15%B；10~30min，80%A+20%B；30~30.1min，60%A+40%B；30.1~40min，0%A+100%B。流速 1mL/min，柱温 30 $^{\circ}$ C，走样时间为 50min，检测波长 530nm，设置完毕保存方法组。

2. 初始设置流动相 A=85%，流动相 B=15%，流速 1 mL/min，待基线稳定后开始加样。

3. 加入标准品 10 μ L，在 50min 内可分离 C3G，C3G 的保留时间在 25min 左右，(柱子不同，保留时间有差异)，计算不同浓度的 C3G 标准品的峰面积。

4. 加入样品 10 μ L，在相应保留时间处检测 C3G 的峰面积。

酶活计算：

1. 以标准品浓度 (μ mol/mL) 为横坐标，峰面积为纵坐标计算 C3G 标准曲线。将样品峰面积代入标准曲线，计算样品 C3G 含量。

2. 酶活单位定义：

A. 每毫克组织蛋白每分钟催化反应产生 1 μ molC3G 定义为一个酶活单位。

$$\text{UFGT 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = \text{C} \times \text{V 反总} \div (\text{V 样} \times \text{Cpr}) \div \text{T} \\ = 0.117 \times \text{C} \div \text{Cpr}$$

B. 每克组织每分钟催化反应产生 1 μ molC3G 定义为一个酶活单位。

$$\text{UFGT 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \text{C} \times \text{V 反总} \div (\text{V 样} \times \text{W} \div \text{V 样总}) \div \text{T} \\ = 0.117 \times \text{C} \div \text{W}$$

C: C3G 浓度, μ mol/mL ; V 反总: 反应总体积, 0.35mL; V 样: 加入样本量, 0.1mL, V 样总: 加入提取液体积, 1mL, Cpr: 蛋白含量, mg/mL; W: 样本质量, g, T: 反应时间, min

注意事项：

1、流速由小到大调节，避免柱压过大。

2、使用完毕时，先用 50%的甲醇水溶液洗色谱柱 45min，再用纯甲醇冲洗色谱柱 30min。

3、标准品的稀释倍数要根据样品中 C3G 浓度确定，样品中 C3G 的峰面积必须落在不同浓度的 C3G 标准品的峰面积之内，该标准品稀释倍数只是一个参考。