

类黄酮糖基转移酶 (UDP-glycose flavonoid glycosyltransferase, UFGT) 试剂盒

微量法 100 管/96 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

花色苷是一类易溶于极性溶剂的天然色素，属黄酮类化合物。花色苷广泛存在于植物的根、茎、叶、花和果实中，使其呈现由红到紫等不同颜色，是植物主要的呈色物质。类黄酮糖基转移酶 (UDP-glycose flavonoid glycosyltransferase, UFGT) 是花色苷合成过程的最后一个酶，可以把不稳定的花色素催化成花色苷，在一定范围内，UFGT 活性与花色素苷的合成呈现正相关。

测定原理：

UFGT 催化 UDPG 与槲皮素生成 UDP；UDP 在丙酮酸激酶与乳酸脱氢酶作用下，氧化 NADH 为 NAD⁺，NAD⁺生成速度与 UDP 含量成正比，通过 340nm 吸光度下降速度反映 UFGT 活性。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存；临用前加入 20mL 试剂四溶解。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：液体 100 μL×1 管，4℃ 避光保存；

试剂四：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存；

样品测定的准备:

按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 冰浴中匀浆。10000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1、在 EP 管中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	180

2、工作液配制: 在试剂二中加入 20mL 试剂四溶解, 再加入 20 μL 试剂三, 混匀待用。用不完的工作液分装后-20℃保存一个月, 禁止反复冻融。

3、在 96 孔板中加入如下试剂

反应液	20
工作液	180

混匀, 测定 340nm 下 1min 时吸光值 A1 与 6min 时吸光值 A2, $\Delta A=A1-A2$ 。

UFGT 活力计算:

1、按照蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。UFGT 活力(nmol/min/mg prot)= $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 10$

$$=134 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟催化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UFGT 活力(nmol/min/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 10 = 134 \times \Delta A \div W$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：96 孔板光径，0.5cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； T ：反应时间，240 min；10，稀释倍数； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量；