

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

试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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:

紫外分光光度计、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液:液体 60mL×1 瓶,4°C 保存;

试剂一:粉剂×1 瓶,-20°C 避光保存;临用前加入 10mL 试剂四溶解。

试剂二:粉剂×1 瓶,-20°C 保存;

试剂三:液体 100μL×1 管,4°C 避光保存;

试剂四:液体 70mL×1 瓶,4°C 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°C 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

混匀,30°C 反应 4h,95°C 水浴 5min 灭活,冷却至室温。10000g 4°C 离心 5min,取反应液待测。

2、工作液配制:在试剂二中加入 50mL 试剂四溶解,再加入 50μL 试剂三,混匀待用。用不完的工作液分装后-20°C 保存一个月,禁止反复冻融。

3、在 1mL 石英比色皿中加入如下试剂

反应液	100
工作液	900

混匀,测定 340nm 下 1min 时吸光值 A1 与 6min 时吸光值 A2,ΔA=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。

$$\text{UFGT 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 2 \\ = 67 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{UFGT 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 2 \\ = 67 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积，1mL； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02 mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，240 min；2，稀释倍数；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量；